

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



**Bc. Petr Škvára**

Příprava a charakterizace modifikovaných virových částic odvozených od myšího  
polyomaviru pro přepravu genů za účelem zvýšení účinnosti transdukce  
Preparation and characterization of modified viral particles derived from mouse polyomavirus  
for the transport of genes to increase the efficiency of transduction

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Hana Španielová, Ph.D.

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6.8.2020

Podpis

**Poděkování:**

Velmi rád bych chtěl poděkovat své školitelce RNDr. Haně Španielové, Ph.D. za její úžasný motivační přístup, nepřeborné rady, trpělivost a cennou pomoc při zpracovávání výsledků a sepisování této diplomové práce. Zároveň bych chtěl poděkovat své konzultantce Mgr. Janě Váňové a také Mgr. et Mgr. Alžbětě Hejtmánkové za jejich neskonalou pomoc a ochotu především během zaučování se nových metod při práci v laboratoři. Rád bych také poděkoval doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc. za přijetí do laboratoře virologie. Děkuji také RNDr. Tomášovi Maškovi, Ph.D. za poskytnutí sady testovacích primerů pro kvantifikaci reportérového plazmidu a zároveň RNDr. Michalovi Sýkorovi, Ph.D. za analýzu frakcí po sacharózovém gradientu. Chtěl bych také poděkovat celému kolektivu laboratoře molekulární virologie UK za mnoho cenných a užitečných rad a za příjemné pracovní prostředí. Nakonec bych velmi rád poděkoval své rodině za jejich nesmírnou podporu při studiu.

Tato práce vznikla v letech 2017 až 2020 za finanční podpory Grantové agentury České republiky (GAČR 17-11397S).

## Abstrakt

Virové částice odvozené od myšího polyomaviru mohou být potenciálně využity pro dopravu terapeutických genů či léčiv do cílových buněk. Tato práce se zabývá přípravou a charakterizací polyomavirových částic modifikovaných pomocí peptidů, které penetrují membrány s cílem vytipovat vhodné přístupy pro zvýšení efektivity transdukce reportérového genu do lidských buněk. V práci je analyzován transdukční potenciál virových částic tvořených hlavním kapsidovým proteinem VP1 v kombinaci s minoritním kapsidovým proteinem VP2 a s modifikovaným minoritním strukturním proteinem VP3, který je fúzován s oktaargininem, peptidem LAH4 nebo transdukční doménou adenovirového proteinu VI. Tato práce současně sleduje vliv modifikace na schopnost částic enkapsidovat heterologní DNA. Na základě testování účinnosti transdukce reportérového genu pro luciferázu pomocí modifikovaných částic se ukázalo, že žádná varianta připravených částic významně nezvýšila, ale naopak snížila efektivitu transdukce reportérového genu ve srovnání s nemodifikovanými částicemi. Práce tak přispívá svými poznatky k pochopení role minoritních kapsidových proteinů polyomaviru při přenosu genů a k návrhu nových strategií pro modifikaci částic odvozených od myšího polyomaviru pro jejich využití v nanomedicině.

**Klíčová slova:** myší polyomavirus, pseudoviriony, viru podobné částice, minoritní kapsidové proteiny polyomaviru, transdukce, peptidy penetrující membrány

## **Abstract**

Viral particles derived from mouse polyomavirus can be potentially used as a delivery system for therapeutic genes and drugs into target cells. This thesis focuses on preparation and characterization of polyomaviral particles that are modified with cell-penetrating peptides in order to increase efficiency of transduction of reporter genes into human cells. Viral particles that are composed of major capsid protein VP1 in combination with minor capsid protein VP2 and minor capsid protein VP3 that is modified with octaarginine, LAH4 peptide or with transduction domain of adenoviral protein VI are analysed in transduction assays. The thesis also provides information about the effect of the modification on encapsidation of heterologous DNA. The results of transduction assays performed with modified particles containing encapsidated luciferase gene revealed that efficiency of transduction did not increase but decreased in comparison with unmodified particles. These findings help to elucidate the role of polyomaviral minor capsid proteins in gene transfer mediated by viral particles and contribute to the design of new strategies for modifications of viral particles derived from mouse polyomavirus for their successful application in nanomedicine.

**Key words:** mouse polyomavirus, pseudovirions, virus-like particles, minor capsid proteins of polyomavirus, transduction, cell-penetrating peptides

# Obsah

1. Úvod.....	10
2. Přehled literatury.....	11
2.1 Myší polyomavirus .....	11
2.1.1 Struktura MPyV .....	12
2.1.1.1 VP1 .....	12
2.1.1.2 VP2 a VP3 .....	13
2.1.2 Transport viru do jádra .....	15
2.2 Transdukční systém založený na VLP odvozených od myšího polyomaviru .....	16
2.3 Peptidy penetrující membrány .....	17
2.3.1 Mechanismus internalizace CPP .....	19
2.3.2 Modifikace VLP pomocí CPP .....	21
2.3.3 Polyarginin.....	22
2.3.4 LAH4 .....	23
2.3.5 FSW .....	23
3. Cíle.....	25
4. Materiál a metody .....	26
4.1 Materiál.....	26
4.1.1 Přístroje.....	26
4.1.2 Laboratorní vybavení.....	27
4.1.3 Software .....	28
4.1.4 Chemikálie .....	28
4.1.5 Používané roztoky.....	29
4.1.6 Antibiotika .....	30
4.1.7 Protilátky.....	30
4.1.8 Enzymy .....	31
4.1.9 Vektory .....	31
4.1.9.1 Reportérový plazmid.....	31
4.1.9.2 Pomocné plazmidy.....	31

4.1.10 Modifikované virové proteiny .....	32
4.1.11 Primery .....	33
4.1.12 Kultivační media .....	33
4.1.13 Bakteriální kmeny a buněčné linie a viry .....	34
4.1.14 Markery molekulových hmotností .....	34
4.1.15 Komerční soupravy a produkty .....	35
4.2 Metody .....	36
4.2.1 Sterilizace .....	36
4.2.2 Práce s bakteriálními kmeny .....	36
4.2.2.1 Propagace a izolace plazmidů .....	36
4.2.3 Práce s tkáňovými kulturami .....	37
4.2.3.1 Pasážování buněčné linie 293TT .....	37
4.2.3.2 Ko-transfekce buněk 293TT pomocným a reportérovým plazmidem .....	37
4.2.3.3 Pseudoinfekce buněk pseudoviriony .....	38
4.2.3.4 Test životaschopnosti buněk po pseudoinfekci .....	38
4.2.3.5 Luciferázový test .....	39
4.2.4 Izolace pseudovironů .....	39
4.2.4.1 Ultracentrifugace v CsCl gradientu .....	39
4.2.4.2 Dialýza frakčních skupin .....	40
4.2.5 Práce s transmisním elektronovým mikroskopem .....	41
4.2.6 Manipulace s DNA .....	42
4.2.6.1 Štěpení DNA restrikčními enzymy .....	42
4.2.6.2 Agarózová elektroforéza .....	42
4.2.6.3 Ošetření DNA RNázou A/T1 .....	43
4.2.7 Manipulace s pseudoviriony .....	43
4.2.7.1 Ošetření částic DNázou TURBO .....	43
4.2.7.2 Ošetření částic DNázou I .....	43



4.2.7.3 Absolutní kvantifikace DNA via qPCR.....	43
4.2.7.4 Fenol-izoamylalkohol-chloroformová extrakce DNA z pseudovirionů .....	44
4.2.8 Manipulace s proteiny.....	45
4.2.8.1 Detekce virových proteinů metodou dot blot .....	45
4.2.8.2 Měření koncentrace proteinů pomocí Qubit .....	46
4.2.8.3 Srážení proteinů methanolem .....	46
4.2.8.4 SDS-PAGE a přenášení proteinů na nitrocelulózovou membránu .....	46
4.2.8.5 Barvení membrány komerčním roztokem .....	47
4.2.8.6 Imunobarvení (western blot).....	47
4.2.8.7 Barvení gelu po přenesení proteinů na membránu .....	48
5. Výsledky .....	49
5.1 Příprava modifikovaných i nemodifikovaných virových částic .....	49
5.1.1 Příprava plazmidových konstruktů .....	49
5.1.2 Izolace virových částic.....	51
5.2 Charakterizace částic .....	56
5.2.1 Přímá detekce částic prostřednictvím TEM.....	56
5.2.2 Stanovení koncentrace proteinů .....	60
5.2.3 Ověření přítomnosti modifikovaného VP3 proteinu v pseudovirionech .....	60
5.2.4 Stanovení množství enkapsidované pDNA v pseudovirionech .....	64
5.2.4.1 Absolutní kvantifikace pDNA uvnitř částic.....	65
5.2.4.2 Extrakce plazmidu z pseudovirionů a její absolutní kvantifikace .....	67
5.3 Srovnání účinnosti transdukce pseudoviriony .....	71
5.3.1 Luciferázový test.....	72
5.3.2 Luciferázový test (s DNázou I).....	73
6. Diskuse.....	76
7. Souhrn.....	85
8. Seznam použité literatury .....	87

## Seznam zkratek

293TT	lidská embryonální ledvinová buněčná linie 293TT
AK	aminokyselina
Ca <sup>2+</sup>	vápenaté ionty
CPP	peptidy penetrující membrány
demiH <sub>2</sub> O	demineralizovaná voda
dH <sub>2</sub> O	destilovaná voda
DMEM	Dulbecco modifikované Eagle médium
DMSO	dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco fyziologický roztok pufrovaný fosfátem
dsDNA	dvouvláknová DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylenndiamintetraoctová kyselina
EF-1a	lidský elongační faktor 1a
EGFP	vylepšený zelený fluorescenční protein
ELISA	imunisorbentový test využívající enzym
ER	endoplazmatické retikulum
ERAD	degradace asociovaná s endoplazmatickým retikulem
ERp29	protein endoplazmatického retikula 29
HD1/2/3	hydrofobní domény
HIV	virus lidské imunodeficiency
Hsp70	protein teplotního šoku 70
HTLV-1	lidský T-lymfotropní virus 1
LB médium	Luria-Bertani médium
LT-Ag	velký tumorogenní antigen
LTR	dlouhé koncové repetice
LU	luciferázová jednotka
MAP	mnohočetný antigenní peptid
miRNA	mikroRNA
MPyV	myší polyomavirus
MT-Ag	střední tumorogenní antigen
MTS	tetrazoliová sůl
NCCR	nekódující kontrolní oblast

NEAA	neesenciální aminokyseliny
NK	negativní kontrola
NLS	jaderný lokalizační signál
ori	počátek replikace (origin)
PBS	fyziologický roztok pufrovaný fosfátem
pDNA	plazmidová DNA
PsV	pseudovirion
PTA	kyselina fosfo-wolframová
PTD	transdukční domény proteinu
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RLU	relativní luciferázová jednotka
SD	výběrová směrodatná odchylka
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SEM	střední chyba průměru
siRNA	malá interferující RNA
SOC médium	médium se super optimálním bujónem a katabolickým represorem
ST-Ag	malý tumorogenní antigen
SV40	opičí virus 40
T-antigen	tumorogenní antigen
Tat	transaktivátor transkripce („transactivator of transcription“)
TBE	Tris-borát-EDTA pufr
TEM	transmisní elektronový mikroskop
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
tVP3	zkrácený minoritní strukturní protein polyomaviru
VLP	částice podobná viru
VP1	majoritní strukturní protein polyomaviru
VP2	minoritní strukturní protein polyomaviru
VP3	minoritní strukturní protein polyomaviru
wt	divoký kmen MPyV

# 1. Úvod

Viry jsou vnitrobuněční parazité, jejichž primárním cílem je dopravit svou genetickou informaci do jádra buňky, která je schopna produkovat nové infekční virové potomstvo. V současnosti se proto některé viry stávají lukrativními nástroji genového inženýrství, za účelem využít přirozené schopnosti některých virů pro dopravu genů zájmu do jádra. Mezi takové viry patří například polyomaviry, které se staly jedním z hlavních studovaných subjektů laboratoře virologie.

Polyomaviry jsou malé neobalené DNA viry. Jedním z nejprostudovanějších členů této skupiny virů je myší polyomavirus (MPyV), který společně s opičím virem 40 (SV40) patří mezi modelové zástupce polyomavirů. Částice MPyV je tvořena ze tří strukturních proteinů VP1, VP2 a VP3. Povrch kapsidy MPyV je tvořen hlavním strukturním proteinem VP1, jehož role je mimo jiné zprostředkovat internalizaci částice do buňky. Zatímco VP2 a VP3 pravděpodobně hrají roli v úniku viru z buněčného kompartmentu, což ve výsledku vede k transportu genetické informace do jádra. Díky jednoduchému designu částic MPyV společně se schopností nespecificky enkapsidovat DNA o velikosti virového genomu, která činí přibližně 5,3 kbp, je možné tvorbou rekombinantních strukturních proteinů připravit částice odvozené od MPyV, které jsou schopné transdukovat gen zájmu. Takové částice proto mají potenciál sloužit jako vektory pro genovou terapii.

V laboratoři virologie se pokoušíme částice odvozené od MPyV modifikovat pomocí peptidů penetrujících membrány (CPP) za účelem zvýšení transdukční schopnosti rekombinantních částic. CPP jsou širokou skupinou syntetických peptidů a transdukčních domén, které se vyznačují svou schopností narušovat membrány a spouštět internalizační dráhy buněk. Svým efektem CPP mohou pomoci jiným molekulám, jako jsou DNA, RNA, proteiny a nanočástice, v internalizaci do buňky či dokonce v úniku z endozomálního kompartmentu.

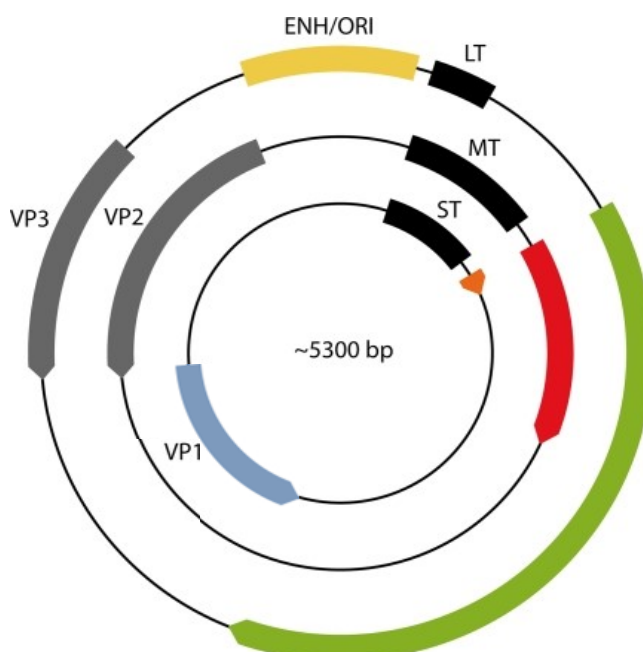
Tato diplomová práce konkrétně cílí na možnost geneticky modifikovat vnitřní kapsidový protein VP3 prostřednictvím oktaargininu, LAH4 peptidu, nebo transdukční domény proteinu VI odvozeného od adenoviru za účelem potenciálně zvýšit efektivitu transdukce částic odvozených od MPyV.

## 2. Přehled literatury

### 2.1 Myší polyomavirus

Podle současného taxonomického členění, navrženého Mezinárodním výborem pro klasifikaci virů, je myší polyomavirus (MPyV) zařazen do čeledi *Polyomaviridae*, řádu *Alfapolyomavirus* a má druhové označení *Mus musculus polyomavirus 1* (Calvignac-Spencer *et al.*, 2016).

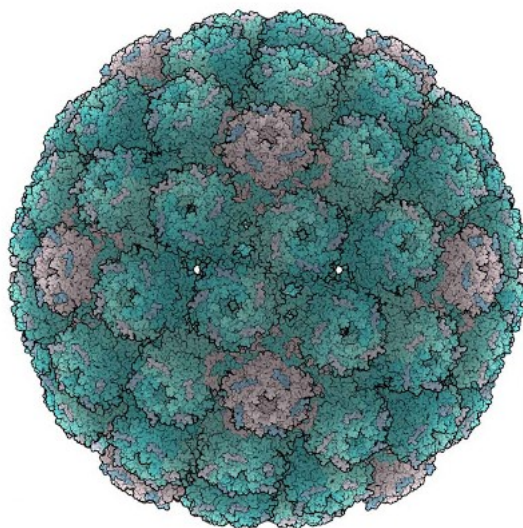
MPyV má cirkulární dsDNA genom, jehož velikost se pohybuje kolem 5,3 kbp. Genom je členěn do tří specifických oblastí (viz obrázek 1). Nekódující kontrolní oblast (NCCR) obsahuje promotory, enhancery a replikační počátek. Oblast, kde se nachází regulační geny, tedy gen pro malý T-antigen (ST-Ag), střední T-antigen (MT-Ag) a velký T-antigen (LT-Ag), se označuje jako oblast časných genů. Třetí oblast se označuje jako pozdní, neboť geny kódované v této části genomu jsou exprimovány až v pozdější fázi replikačního cyklu viru. Tato oblast obsahuje geny strukturních proteinů VP1, VP2 a VP3. Virové částice jsou neobalené a jejich průměr činí přibližně 45 nm. Virová kapsida se skládá z majoritního strukturního proteinu VP1 a minoritních strukturních proteinů VP2 a VP3. Uvnitř kapsidy se nachází právě jeden virový genom v komplexu s buněčnými histony H2A, H2B, H3 a H4, čímž tvoří tzv. minichromozom (Crémisi *et al.*, 1976; Winston *et al.*, 1980).



**Obrázek 1: Schéma genomu myšího polyomaviru [převzato a upraveno podle Flucka a Schaffhausena (2009)]** - Na obrázku je vyznačená nekódující kontrolní oblast ENH/ORI (žlutě). Vpravo jsou vyobrazeny čtecí rámce časných genů. LT je velký T-antigen, MT je střední T-antigen a ST znamená malý T-antigen. Barevně jsou vyjádřeny rozdíly ve čtecích rámcích jednotlivých T-antigenů. Vlevo jsou vyobrazeny čtecí rámce pozdních genů VP1 (modře), VP2 a VP3 šedě.

### 2.1.1 Struktura MPyV

Kapsida MPyV vykazuje ikosahedrální symetrii ( $T = 7d$ ). Virová částice se skládá celkem ze 72 kapsomer. Každá kapsomera je pak tvořena pěti monomery hlavního strukturního proteinu VP1 (dohromady kapsidu tvoří 360 monomerů VP1 uspořádaných do 72 pentamerů). Virová částice je tvořena 12 pentavalentními a 60 hexavalentními pentamery (Rayment *et al.*, 1982). Každá kapsomera může navíc disponovat právě jedním zabudovaným minoritním strukturním proteinem VP2, nebo VP3 (Barouch a Harrison, 1994; Chen *et al.*, 1998). Pro pentamery VP1 platí, že jsou schopné se samovolně skládat do formy kapsidy bez účasti dalších virových komponentů (Salunke *et al.*, 1989). Částice, které jsou tvořeny pouze ze strukturních proteinů, se označují jako viru podobné částice (VLP). VLP mohou být tvořeny pouze z VP1, anebo z VP1 v kombinaci s VP2 nebo VP3 (Salunke *et al.*, 1986).

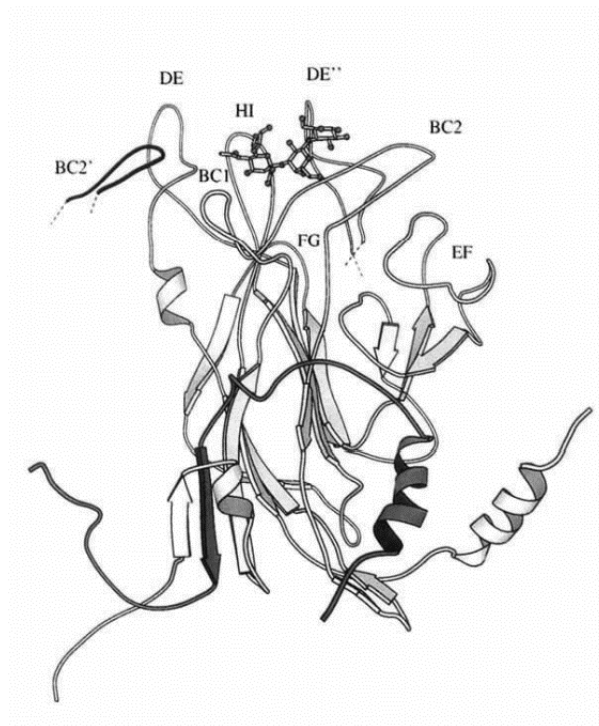


**Obrázek 2: Struktura myšího polyomaviru [obrázek vytvořil Jean-Yves Sgro, 2009 podle Stehle a Harrison, 1996]** - Kapsida se skládá ze 72 pentamerů VP1. Konkrétně je složena z 12 pentavalentních pentamerů (růžově) a 60 hexavalentních pentamerů (tyrkysově).

#### 2.1.1.1 VP1

Majoritní kapsidový protein myšího polyomaviru, VP1, má molekulovou hmotnost 42 kDa a je tvořen z 384 aminokyselin (AK). VP1 je schopen vázat DNA. Za vazbu k DNA je zodpovědná sekvenčně nespecifická DNA-vazebná doména, která se nachází na N-konci proteinu (Carbone *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 1993a; Moreland *et al.*, 1991). Ve stejné sekvenční oblasti byla prokázána i přítomnost jaderného lokalizačního signálu (NLS) (Moreland a Garcea, 1991). C-koncové rameno VP1 je zodpovědné za vazbu mezi dvěma pentamery VP1 a umožňuje tak skládání pentamerů VP1 do podoby kapsidy. Vápenaté ionty společně s disulfidickými můstky zde hrají roli ve stabilizaci vazby mezi pentamery VP1 (Garcea *et al.*, 1987; Ishizu *et al.*, 2001; Stehle *et al.*, 1996). Nepřítomnost  $\text{Ca}^{2+}$  iontů způsobí

rozpad částic (Brady *et al.*, 1977), zatímco nepřítomnost disulfidických můstků pouze destabilizuje částice (Schmidt *et al.*, 2000). Protein VP1 je strukturně tvořen převážně z beta-listů, které jsou propojeny smyčkami. Mezi významné smyčky patří povrchové smyčky BC, DE, HI a EF, které umožňují interakci s buněčnými receptory. Smyčky BC a HI jsou zodpovědné za interakci s kyselinou sialovou, která je součástí gangliosidových receptorů (Liddington *et al.*, 1991; Stehle a Harrison, 1997, 1996). Smyčky DE a EF jsou pak podle Carusové *et al.*, 2003 zodpovědné za interakci s ko-receptorem MPyV, s integrinem  $\alpha 4\beta 1$ .

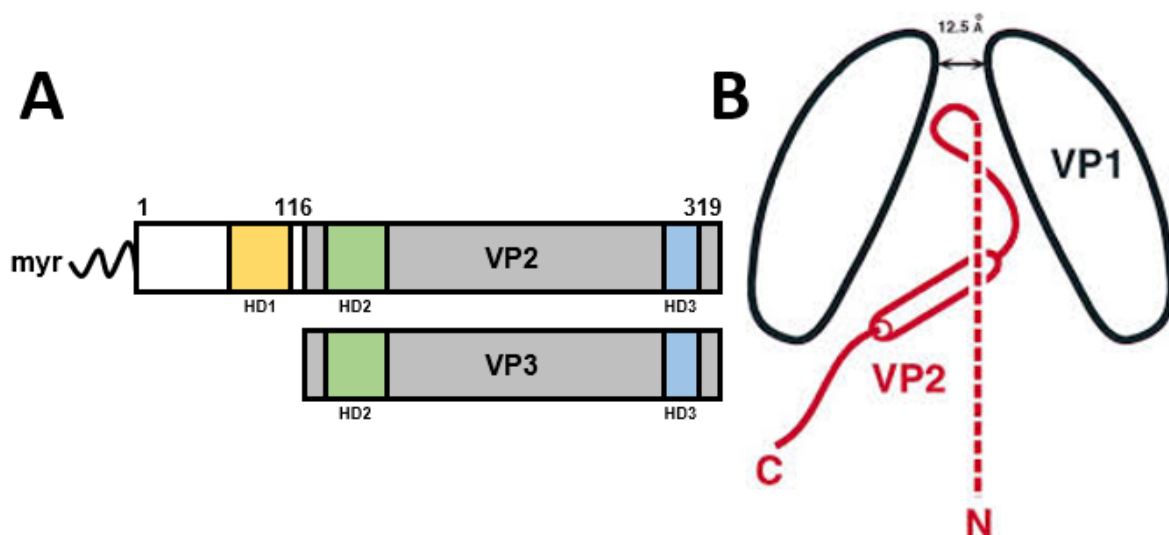


**Obrázek 3: Model monomeru VP1 myšího polyomaviru společně s navázaným analogem receptoru, sialyl laktózou [převzato z Stehle a Harrison (1996)]**

#### 2.1.1.2 VP2 a VP3

Mezi další strukturní proteiny MPyV patří tzv. minoritní kapsidové proteiny VP2 a VP3. VP3 je kratší variantou VP2 a společně sdílí přibližně 2/3 aminokyselinové sekvence zahrnující C-konec (viz obrázek 4A). Molekulová hmotnost VP2 činí 35 kDa, zatímco VP3 má molekulovou hmotnost pouze 23 kDa. Sekvence na C-konci proteinu vytváří hydrofobní  $\alpha$ -helix. V oblasti se současně nachází sekvence zodpovědná za interakci VP2/VP3 s VP1. Chen *et al.* (1998) ve své práci popisuje ukotvení minoritního proteinu do vnitřní oblasti pentameru VP1 (viz obrázek 4B). Další sdílenou C-koncovou oblastí je NLS (Chang *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1993b). Ačkoliv mají minoritní proteiny vlastní NLS, bylo pozorováno, že do jádra se dokáží efektivně translokovat jedině za přítomnosti VP1 (Forstová *et al.*, 1993; Horníková *et al.*, 2017; Soldatova *et al.*, 2018; Stamatou *et al.*, 1987). Pozoruhodně Soldatová

*et al.* (2018) popisuje, že pro translokaci do jádra v myších buňkách je vyžadována funkční NLS doména pouze u jednoho strukturního proteinu (VP1, nebo VP2/3). Během exprese tak v pozdní fázi replikačního cyklu oba proteiny tvoří v cytoplazmě komplex s VP1, který umožňuje jejich efektivní translokaci do jádra (Barouch a Harrison, 1994; Forstová *et al.*, 1993). V jádře pak dochází k enkapsidaci DNA a tvorbě virové kapsidy. Po expresi VP2 je N-konec tohoto proteinu navíc posttranslačně myristylován (Streuli a Griffin, 1987). Ukazuje se, že tato modifikace má význam v replikačním cyklu viru, neboť nepřítomnost této modifikace značně snižuje infekčnost částic (Krauzewicz *et al.*, 1990; Mannová *et al.*, 2002; Sahli *et al.*, 1993). Přestože je pro složení kapsidy esenciální pouze VP1, nepřítomnost VP2 nebo VP3 vede k výraznému snížení až ztrátě infekčnosti virových částic (Mannová *et al.*, 2002; Sahli *et al.*, 1993). Předpokládá se, že minoritní proteiny napomáhají stabilizovat nově vznikající kapsidu během enkapsidace DNA (Moreland *et al.*, 1991).



**Obrázek 4:** Schéma překryvu C-koncové sekvence VP2 a VP3 (šedě) (A) - N-konec VP2 je navíc myristylován. Předpokládané oblasti hydrofobních domén jsou vyznačeny žlutě, zeleně a modře; Schéma znázorňující průřez pentamerem, tvořeného VP1, (černě) s ukotveným minoritním kapsidovým proteinem uvnitř (červeně) (B) - Červený válec představuje hydrofobní alfa-helix a smyčka v blízkosti póru pentameru VP1 obsahuje oblast zodpovědnou za kontakt s VP1. N-koncová oblast zobrazena přerušovanou čarou představuje část VP2 proteinu jehož strukturu se nepodařilo analyzovat [převzato a upraveno z Chen *et al.* (1998) a Huérfano *et al.* (2017)].

VP2 obsahuje tři předpokládané hydrofobní domény (viz obrázek 4A) (Huérfano *et al.*, 2017). Hydrofobní doména 1 (HD1) se nachází v úseku 60-101 AK a je potenciálně zodpovědná za únik viru z endoplazmatického retikula (ER). Hydrofobní doména 2 (HD2) se nachází v úseku 126-165 AK proteinu VP2 a pravděpodobně zodpovídá za vazbu minoritního proteinu k membráně. Mutace v HD2 působí výrazné snížení infekčnosti částic. C-koncová (287-307 AK) hydrofobní doména 3 (HD3) vytváří amfipatický  $\alpha$ -helix, který je pravděpodobně zodpovědný za vazbu k VP1 během skládání kapsidy (Huérfano *et al.*, 2017).



VP2 a VP3 sdílí sekvence HD2 a HD3. Přítomnost těchto předpokládaných hydrofobních domén, především HD1, pravděpodobně umožňuje VP2 destabilizovat membránu ER (Huérfano *et al.*, 2017; Rainey-Barger *et al.*, 2007) a chovat se jako tzv. „viroporín“ (Gonzalez a Carrasco, 2003).

### 2.1.2 Transport viru do jádra

Replikační cyklus MPyV začíná kontaktem virové částice s buněčným receptorem. Pro vstup do hostitelské buňky MPyV interaguje s membránovými glykoproteiny nebo gangliosidy, které obsahují sialovou kyselinu. Avšak pouze kontakt s gangliosidovými receptory GD1a, GT1a a GT1b (Buch *et al.*, 2015; Gilbert *et al.*, 2005; Gilbert a Benjamin, 2004; Tsai *et al.*, 2003) s vázanou sialovou kyselinou (Bauer *et al.*, 1999; Buch *et al.*, 2015; Fried *et al.*, 1981) umožňuje produktivní infekci viru. Určitou roli zde hraje i ko-receptor  $\alpha 4\beta 1$  integrin (Caruso *et al.*, 2003; Neu *et al.*, 2009). Po kontaktu virové kapsidy s receptorem dochází k endocytóze zprostředkované lipidovými rafty (kde je často přítomen caveolin) a tedy nezávislé na klatrinu (Ewers a Helenius, 2011; Gilbert a Benjamin, 2000; Liebl *et al.*, 2006; Neu *et al.*, 2009; Richterová *et al.*, 2001). MPyV je následně transportován z monopinocytického váčku, vzniklého endocytózou, do časného endozómu. Ve většině případů je virus dále dopraven do pozdního endozómu až lysozómu, kde je degradován a nedochází tak k produktivní infekci (Qian *et al.*, 2009). Současný model předpokládá, že v případě produktivní infekce je nutný transport částice do ER. V dopravě virové částice z endozómu do ER se zdá být významný lipidový receptor GD1a (Qian *et al.*, 2009). Důležitou roli zde hraje i acidifikace endozómu a s ní spojená konformační změna kapsidy (Liebl *et al.*, 2006; Qian *et al.*, 2009). Přesný mechanismus, jakým se částice translokují do ER, však není plně objasněn. Diplomová práce od Martina Štacha (2016) nabízí experimentální potvrzení možnosti, že se MPyV translokují do ER přes *trans*-Golgiho síť. Uvnitř ER pak dochází vlivem rezidentního proteinu chaperonu ERp29 k další konformační změně kapsidy. Tato další změna pravděpodobně umožní odhalení vnitřního kapsidového proteinu VP2 i VP3. Oba proteiny se ukazují jako schopné integrovat se do lipidové membrány ER. Avšak pouze VP2 byl schopen destabilizovat membránu. Role VP3 v ER zůstává nejasná (Huérfano *et al.*, 2017; Magnuson *et al.*, 2005; Rainey-Barger *et al.*, 2007). Kromě virových proteinů se na úniku virové částice z ER podílí i další buněčné proteiny. Jedním takovým objasněným proteinem je například Derlin-2, který je zodpovědný za transport špatně sbalených proteinů z ER do cytoplazmy v asociaci s dráhou ERAD (degradace asociovaná s ER) (Lilley *et al.*, 2006). Jakmile se MPyV podaří dostat do

cytosolu, dochází pravděpodobně k částečnému rozpadu virové částice obdobně jako k tomu dochází u jiného viru ze stejné čeledi, SV40 (Kuksin a Norkin, 2012). Za částečný rozpad částice je pravděpodobně zodpovědný cytoplazmatický chaperon Hsp70 (Chromy *et al.*, 2006). Takto rozpadlá částice je posléze za pomoci importinu translokována přes jaderný pór do jádra buňky (Soldatova *et al.*, 2018).

Jakmile se virus dostane do jádra dochází k expresi časných virových antigenů a miRNA (Lagatie *et al.*, 2013). V pozdější fázi replikačního cyklu začne replikace DNA a exprese strukturních proteinů. Tyto proteiny jsou z cytoplazmy v komplexu VP1-VP2/3 dopraveny do jádra, kde dochází ke skládání nových virionů (Soldatova *et al.*, 2018). Jakmile množství virových částic překročí v buňce kritické množství, dojde k uvolnění virionů buněčnou lyzí.

## **2.2 Transdukční systém založený na VLP odvozených od myšího polyomaviru**

V současnosti existuje mnoho systémů pro dopravu genetické informace do jádra buněk založených na systému viru podobných částic, tzv. VLP. Virové systémy využívají schopnost virových částic vázat se specificky na buněčné receptory a transportovat obsah VLP do jádra (Kawano *et al.*, 2018). Tento systém byl například úspěšně použit pro VLP odvozených od retroviru (Dalba *et al.*, 2007), nodaviru (Jariyapong *et al.*, 2014) a od papillomaviru (Malboeuf *et al.*, 2007). Dalším potenciálním kandidátem pro široké uplatnění tohoto systému jsou polyomaviry (Osterman *et al.*, 1970).

Polyomaviry se vyznačují svou schopností tvořit VLP, a to pouze z jediného proteinu, VP1. Do těchto VLP je možné vkládat proteiny a terapeutika o malé molekulové hmotnosti (Suchanová *et al.*, 2015). Pro využití vnitřního prostoru částic lze použít minoritní strukturní proteiny jako kotvy pro příslušné molekuly. Ukotvené molekuly je pak možné tímto systémem dopravit přímo do buněk (Abbing *et al.*, 2004). Jak již bylo zmíněno dříve, VP1 myšího polyomaviru má také schopnost vázat nespecificky DNA, čímž pravděpodobně umožňuje její enkapsidaci během skládání kapsidy (Gillock *et al.*, 1997). Pozoruhodně při *in vitro* experimentech podle Moreland *et al.*, 1991 bylo pozorováno, že vazba DNA k VP1 pravděpodobně inhibuje schopnost skládání VP1 do plnohodnotné kapsidy. Zároveň se předpokládá, že VP2 a VP3, přestože nejsou schopné vázat DNA, přispívají k úspěšné enkapsidaci DNA (Delos *et al.*, 1995; Moreland *et al.*, 1991). Kromě DNA bylo pozorováno, že se do částic dokáže enkapsidovat i RNA. Avšak RNA se enkapsiduje oproti DNA velmi

neochotně (Slilaty *et al.*, 1982). V případě že VLP obsahují enkapsidovanou nevirovou DNA, jsou označovány jako pseudočástice nebo pseudokapsidy.

Protože VLP mohou vznikat i v přítomnosti pouhého VP1, příprava takových částic může být uskutečněna prostou expresí rekombinantního proteinu VP1. Produkce rekombinantního VP1 byla poprvé popsána v bakteriálním expresním systému (Salunke *et al.*, 1986). Protože v bakteriálním expresním systému rekombinantní VP1 tvoří pouze pentamery, Salunkemu *et al.* (1986) se současně podařilo optimalizovat podmínky pro přípravu VLP složených z rekombinantního VP1 v *in vitro* systému. V současnosti je možné produkovat VLP odvozené od MPyV úspěšně přímo v *in celula* systému. Taková produkce VLP byla již popsána pro kvasinkový (Palková *et al.*, 2000), bakulovirový (Forstová *et al.*, 1993) a savčí expresní systém (Tolstov *et al.*, 2009). K sestavení polyomavirové částice v takovém případě dochází přímo v jádře buňky (Spanielová *et al.*, 2014). V případě, že je v takovém produkčním systému přítomen i vektor o velikosti virového genomu dochází k jeho zabalení (enkapsidaci) do virových částic ve formě minichromozomu. Takové částice tak napodobují viriony a jsou proto označovány jako pseudoviriony (PsV).

Existuje tedy možnost nejprve vyprodukovat VLP pomocí příslušného expresního systému, poté VLP izolovat, purifikovat, a následně v *in vitro* systému do částic enkapsidovat vybrané terapeutické molekuly, či DNA. Pseudočástice odvozené od MPyV připravené v bakulovirovém expresním systému je možné následně použít jako vektory schopné transdukovat exogenní DNA do jádra krysích i lidských buněk (Forstová *et al.*, 1993, 1995). Úspěšně lze také využít těchto pseudočástic pro transdukcii reporterového genu do myších tkání *ex vivo* a *in vivo* (Krauzewicz *et al.*, 2000).

Dosavadním nedostatkem transdukčního systému založeného na MPyV je poměrně nízká efektivita viru dostat se až do jádra. Značná část virových částic nedokáže uniknout z pozdního endozómu a končí proto v lysozómu, kde dochází k degradaci (Qian *et al.*, 2009). Za účelem zlepšení této schopnosti uniknout z endozómu byl navržen systém částic odvozených od MPyV asociovaných s peptidy penetrujícími membrány.

## 2.3 Peptidy penetrující membrány

Peptidy penetrující membrány (z angl. „cell-penetrating peptides“, CPP), též označovány jako transdukční domény proteinu (PTD), představují širokou skupinu krátkých aminokyselinových sekvencí (nejčastěji o délce 5-35 AK) schopných prostupovat buněčnou membránou. V současnosti existuje již několik stovek popsáných CPP. Tyto peptidy jsou velmi variabilní skupinou a mohou se od sebe lišit sekvencí, funkcí, původem, mechanismem,

jakým vstupují do buňky, ale i využitím v biomedicině. CPP lze kategorizovat do dvou hlavních skupin podle fyzikálně-chemických vlastností: kationické (i) a amfipatické (ii) (Váňová *et al.*, 2019).

Kationické CPP jsou krátké peptidy nesoucí pozitivní náboj za fyziologického pH v důsledku vysokého zastoupení lysinu a argininu. Mezi nejvýznamnější CPP této skupiny patří například Tat<sub>49-57</sub> [RKKRRQRRR] a Tat<sub>48-60</sub> [GRKKRRQRRRPPQ]. Oba peptidy jsou odvozené ze sekvence Tat proteinu viru HIV-1 (Frankel a Pabo, 1988; Park *et al.*, 2002; Vivès *et al.*, 1997). Dalšími kationickými CPP jsou synteticky připravené polyargininy [R<sub>4-16</sub>] (Futaki *et al.*, 2001; Tünnemann *et al.*, 2008) a penetratin [RQIKIWFQNRRMKWKK]. Penetratin je peptidová sekvence odvozená od homeodomény *Antennapedia* (*Antp*) získaná z druhu *Drosophila melanogaster* (Derossi *et al.*, 1994; Joliot *et al.*, 1991).

Amfipatické CPP jsou peptidy, které mají oddělenou oblast polárních a nepolárních AK. Do této skupiny spadá například chemicky syntetizovaná sekvence MAP (z angl. „multiple antigenic peptide“) [KLALKLALKALKAALKLA] (Oehlke *et al.*, 1998) a sekvence odvozená z vaskulárního endoteliálního kadherinu pVEC [LLIILRRRIRKQAAHASK] (Elmqvist *et al.*, 2006). Součástí této skupiny jsou také uměle designované peptidy, které jsou složeny ze dvou kovalentně navázaných funkčně odlišných sekvencí. Jedna sekvence je zodpovědná za transport přes buněčnou membránu a druhá sekvence funguje jako NLS. Příkladem takového peptidu je MPG, což je sekvence HIV glykoproteinu 41 fúzovaná s NLS T-antigenu SV40 [GALFLGLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV]<sup>1</sup>. Dalším příkladem chimérického peptidu je Pep-1, což je sekvence bohatá na tryptofan fúzovaná s NLS T-antigenu SV40 [KETWWETWWTEWSQPKKKRKV]<sup>2</sup> (Morris *et al.*, 2008).

Existují ovšem i další skupiny jako například hydrofobní CPP, které se vyznačují vyšším zastoupením nepolárních AK. Patří sem například syntetický peptid C105Y [PFVYLI], jenž je odvozen ze sekvence  $\alpha$ 1-antitrypsinu (Rhee a Davis, 2006). Dále existuje skupina osmolytických CPP, které se vyznačují přítomností oblasti bohaté na histidin. Anebo kombinované CPP, jako je například LAH4, který je označován jako kationický amfipatický peptid bohatý na histidin (Kichler *et al.*, 2006).

Významnou rolí CPP je, že napomáhají velkému spektru biologicky aktivních látek při jejich dopravě do buněk. Tento efekt byl pozorován v *in vitro* i v *in vivo* systému (Nakase *et al.*, 2012). Mezi biologicky aktivní látky patří zejména malé terapeutické molekuly (Nakase *et*

---

<sup>1</sup> Podtržený úsek vyjadřuje sekvenci NLS

<sup>2</sup> Podtržený úsek vyjadřuje sekvenci NLS

*al.*, 2012), siRNA (Endoh a Ohtsuki, 2009), DNA (Karro *et al.*, 2015) a proteiny (Ramakrishna *et al.*, 2014). Kromě těchto látek se ukázalo, že některé CPP také přispívají k efektivnější dopravě nanočástic (Luo *et al.*, 2019) a virů (Váňová *et al.*, 2019).

CPP tedy mohou široce přispět k efektivnější dopravě terapeutických látek do buněk, čímž si získaly pozornost ve vývoji potenciálních léčiv proti rakovině (Borrelli *et al.*, 2018; Ramsey a Flynn, 2015; Raucher a Ryu, 2015; Sunavala-Dossabhoy, 2020). Díky schopnosti některých CPP translokovat se k jádru se staly i potenciálním kandidátem v oblasti genové terapie (Nakase *et al.*, 2012).

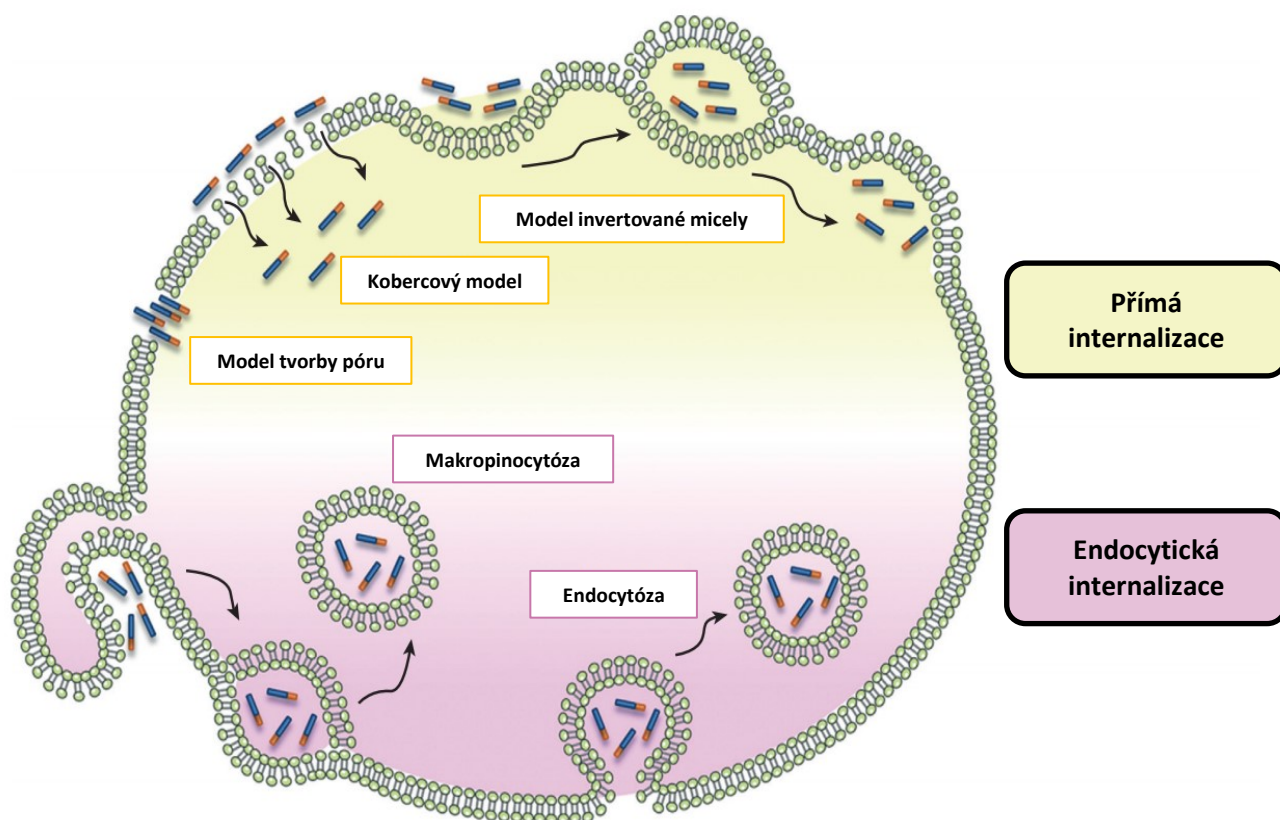
### **2.3.1 Mechanismus internalizace CPP**

CPP jsou schopné ve vysoké koncentraci přímo interagovat s buněčnou membránou a prostupovat skrz do cytoplazmy, mechanismem nezávislým na dodání energie. V současnosti existují tři modely přímé translokace přes buněčnou membránu: model invertované micely (i), kobercový model (ii) a model „toroidálního“ póru nebo „barelového“ póru (iii) (Koren a Torchilin, 2012).

Model invertované micely byl navržen Kawamotem *et al.* (2011) pro vysvětlení mechanismu, jakým penetratin prostupuje do cytosolu. Tento model ukazuje, že kladně nabitě AK zbytky na sebe nabalí záporně nabitě fosfolipidy, čímž dojde k pohlcení klastru peptidů mezi dvojvrstvou membrány a vytvoření invertované micely. Asymetrie dvojvrstvy membrány byla popsána jako nutná hnací síla pro translokaci klastru CPP k vnitřní cytoplazmatické vrstvě membrány. Podle kobercového modelu se CPP s kladným nábojem elektrostaticky vážou na záporně nabitě fosfolipidy membrány. Se zvyšujícím se počtem CPP pak dochází k destabilizaci membrány a k tvorbě pórů, které umožní translokaci CPP dovnitř buňky (Shai, 2002). Model „toroidálního“, nebo „barelového“ póru popisuje, že některé CPP se mohou přímo zabudovávat do membrány a vytvářet tak pór v podobě toroidu, nebo barelu, čímž umožní prostupnost dalších CPP, nebo CPP v komplexu s další molekulou (Herce *et al.*, 2014, 2009; Herce a Garcia, 2007).

Přestože jsou CPP schopné přímo prostupovat přes buněčnou membránu, jejich primární cesta internalizace je přes endocytickou dráhu, což je energeticky závislý proces (Richard *et al.*, 2003). CPP mohou využívat k internalizaci endocytózu závislou i nezávislou na klathrinu anebo makropinocytózu. To, jakým způsobem je CPP endocytován záleží na buněčném typu, na vlastnostech daného peptidu a jeho koncentraci. Pokud je CPP navázán na nějakou částici nebo molekulu, pak se endocytická dráha odvíjí i podle vlastností dané částice, či molekuly (Duchardt *et al.*, 2007).

Po endocytóze jsou CPP lokalizovány v endozómu odkud dochází k jejich úniku do cytoplazmy. Jedním takovým mechanismem je tzv. efekt „protonové houby“, který byl popsán pro peptidy bohaté na histidin. V endozómu dochází vlivem nízkého pH k protonaci histidinových zbytků, což způsobí přísun chloridových iontů spolu s molekulami vody dovnitř endozómu. Endozóm se následně vlivem osmotického tlaku roztrhne, čímž umožní únik potenciálního nákladu i CPP do cytosolu (Midoux *et al.*, 2009). Další možností je, že některé CPP unikají z endozómu přímou interakcí s membránou. Tedy, že CPP destabilizují endozomální membránu a potenciálně vytváří póry, anebo se přímo zabudují do membrány endozómu a vytváří příslušné póry, což umožní dalším CPP i s potenciálním nákladem unikat do cytosolu.



**Obrázek 5: Reprezentativní schéma mechanismů internalizace CPP [převzato a upraveno z Guidotti *et al.* (2017)]** - Peptid penetrující membrány (CPP) s navázaným terapeutikem je vyobrazen jako modro-oranžová tyčinka. Cytoplazmatická membrána je znázorněna zeleně. Schéma je rozděleno podle dvou zmíněných způsobů internalizace. Přímá internalizace CPP (žlutě) s příslušnými navrženými modely je zobrazena v horní části a endocytická internalizace CPP (růžově) se znázorněnou makropinocytózou a endocytózou je zobrazena v dolní části.

### 2.3.2 Modifikace VLP pomocí CPP

Zajištění, anebo zefektivnění transdukce založené na VLP lze docílit například pomocí CPP, které disponují schopností internalizovat se do buněk a schopností unikát z endozomálního kompartmentu (např.: polyargininy nebo peptidy bohaté na histidin). Váňová *et al.* (2019) ve svém článku zmiňuje, že virové částice mohou po asociaci s CPP vykazovat odlišnou internalizační dráhu, což může potenciálně vést ke zlepšení účinnosti transdukce příslušných částic.

Částice se dají modifikovat dvěma principiálními způsoby: nekovalentně (i) a kovalentně (ii). Z toho každý způsob modifikace přináší různé uplatnění, výhody a limitace. Nekovalentní modifikace je zpravidla nejsnazší na provedení a znamená, že CPP se váží na částice pravděpodobně vlivem elektrostatických sil (Liu *et al.*, 2014). Není však vyloučeno, že vazba CPP k částici nemůže být podpořena i jinými silami (např.: vodíkovými vazbami a hydrofobními interakcemi), jak tomu bylo popsáno v případě interakce CPP se záporně nabitými lipidovými váčky (Hitz *et al.*, 2006). Obecně však nedochází k tvorbě pevné vazby mezi částicí a CPP. K uskutečnění nekovalentní modifikace většinou postačí prostá inkubace částic s CPP za pokojové teploty (Park *et al.*, 2010; Youn *et al.*, 2008). Nevýhodou tohoto přístupu je, že za účelem získání konzistentních výsledků je třeba částice s CPP inkubovat vždy za stejných podmínek. Odchytky v podmínkách inkubace, nebo množství částic nebo CPP může vést k odlišnému chování modifikovaných částic. Další limitací je, že si tato metoda často žádá velkou spotřebu purifikovaných CPP, což může být časově i finančně nákladné (Váňová *et al.*, 2019). Příkladem, kde byl tento typ modifikace úspěšně pospán, jsou studie zabývající se zlepšením transdukčního potenciálu rekombinantního adenoviru (Park *et al.*, 2010; Youn *et al.*, 2008).

Modifikace lze provádět i kovalentně, konkrétně chemicky. Vazby CPP k částici může být docíleno přes reaktivní AK zbytky (cystein, lysin, glutamát a aspartát). Chemickým způsobem byla například zvýšena efektivita transdukce u adenoviru modifikovaného Tat peptidem, nebo polyargininem (Eto *et al.*, 2009; Nigatu *et al.*, 2015). Avšak v některých případech může být tento přístup velmi drahý, málo stabilní a obtížný pro charakterizaci (Wang *et al.*, 2016).

Poslední způsob, jak kovalentně navázat CPP k částici, je geneticky. Tedy tvorbou fúzního proteinu se sekvencí CPP. V tomto případě je do vybraného rekombinantního virového proteinu cíleně vložena sekvence CPP. Nicméně manipulace s proteinovou sekvencí může vést k oslabení až ztrátě původní funkce mutovaného proteinu. Tento typ modifikace

proto vyžaduje promyšlený design, aby funkce modifikovaného proteinu zůstala zachována. Podle Váňové *et al.* (2019) může být genetická modifikace oproti ostatním přístupům kotvení CPP na virové částice výhodnější, neboť lze dosáhnout předem daného zastoupení CPP na částici. Charakter virových částic s genetickou modifikací se proto v rámci jednotlivých experimentů neliší a v některých případech může genetická modifikace virové částice pomocí CPP zvýšit stabilitu příslušného CPP, čímž zabraňuje rychlé degradaci peptidu uvnitř organismu (Váňová *et al.*, 2019).

Tento typ modifikace byl popsán například pro adenovirus (Han *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2011), bakulovirus (Chen *et al.*, 2011) a bakteriofág lambda (Eguchi *et al.*, 2001).

Tato práce má za cíl zjistit, jaký efekt na transdukcii pseudovirionů, odvozených od MPyV, má kovalentní modifikace minoritního kapsidového proteinu VP3 třemi různými CPP. Jedná se o modifikaci sekvencí polyargininů, LAH4 peptidem a peptidem odvozeným od adenovirového kapsidového proteinu VI, FSW.

### 2.3.3 Polyarginin

Jedněmi z nejstudovanějších CPP jsou krátké peptidy tvořené sadou čtyř až šestnácti argininů [R<sub>4</sub>-R<sub>16</sub>], tzv. polyargininy, nebo oligoargininy. Tento peptid spadá do skupiny kationických peptidů. Jedná se o uměle připravený peptid, který vychází z aminokyselinové sekvence Tat proteinu viru HIV-1 bohaté na argininy [RKKRRQRRR] (Futaki *et al.*, 2001). Polyarginin má schopnost indukovat makropinocytózu aktivací Rac proteinu, jenž je zodpovědný za organizaci filamentárního aktinu (Nakase *et al.*, 2007). Pro internalizaci polyargininu je velmi důležitá přítomnost proteoglykanů na povrchu membrány (Futaki *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2002). Dalším způsobem, jak se polyargininy internalizují, je přímo přes membránu buňky mechanismem při kterém vznikají v membráně transientní póry z peptidů (Herce *et al.*, 2009). Tyto peptidy jsou navíc schopné destabilizovat membránu, čímž zvyšují permeabilitu membrány a s ní spojenou schopnost unikat z endozomálního kompartmentu do cytosolu (Hitz *et al.*, 2006). Polyargininy také pomáhají fúzi lipozomů s endozomální membránou, čímž umožňují vylití lipozomálního nákladu do cytoplazmy (El-Sayed *et al.*, 2008). Obecně tedy polyargininy zvyšují internalizační potenciál. Dodatečně bylo zjištěno, že polyargininové peptidy často translokují až k jádru, čímž také přispívají ke zvýšení transdukčního potenciálu připojených molekul (Liu *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2011). Polyargininy mají navíc i nízkou cytotoxicitu v množství, které vykazuje vysoký transdukční



potenciál. Tato vlastnost tak podporuje potenciální využití tohoto CPP v medicíně (Tünnemann *et al.*, 2008).

Studie provedená Futakim *et al.* (2001) dokládá jako optimální sekvenci právě osm argininů (octaarginin; R<sub>8</sub>). Zatímco sekvence tetraargininu [R<sub>4</sub>] se neinternalizovala do buněk téměř vůbec. Peptidy, které byly delší než osm argininů, vykazovaly s rostoucí délkou nižší schopnost internalizovat se do buněk spolu se snižující se schopností translokovat se až k jádru.

Tento peptid fúzovaný s některým z minoritních kapsidových proteinů by tak mohl být schopen napomoci částicím odvozeným od MPyV, u kterých dochází k rozvolnění kapsidy v endozomálním kompartmentu nebo ER, dostat se snáz do cytosolu a konsekventně až do jádra.

### 2.3.4 LAH4

Peptid LAH4 je další potenciální CPP, který je tvořen sekvencí leucinů, alaninů a 4 histidinů. Histidiny jsou v peptidové sekvenci umístěny tak, aby vystupovaly na stejné straně terciární struktury peptidu, alfa-helixu (Kichler *et al.*, 2003). Zároveň bývá na obou koncích obohacen o dva lysiny, které zaručují lepší rozpustnost peptidu ve vodném prostředí a napomáhají ukotvení se k membráně (Bechinger *et al.*, 2011). Dále se ukazuje, že LAH4 zvyšuje internalizaci nákladu do buněk (Liu *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2012). Po internalizaci do buňky je LAH4 společně s nákladem dopraven do endozómu, kde dochází k interakci peptidu s endozomální membránou. Islami *et al.* (2014) ve své práci demonstruje, že oproti neutrálnímu pH (pH = 7,0) je peptid v kyselém pH (pH = 5,0) schopný lépe destabilizovat anionickou membránu. V důsledku acidifikace endozómu tak pravděpodobně dochází vlivem LAH4 peptidu k destabilizaci endozomální membrány a potenciálnímu úniku příslušného nákladu z endozómu.

Dosud bylo popsáno, že LAH4 dokáže dobře internalizovat DNA (Kichler *et al.*, 2003), siRNA (Langlet-Bertin *et al.*, 2010), CpG oligonukleotidy (Zhang *et al.*, 2012) i velké proteiny jako beta-galaktosidázu (Moulay *et al.*, 2017). Zároveň tento peptid zvyšuje transdukční schopnost vektorů odvozených od lentiviru (Majdoul *et al.*, 2016) a od adenovirus-asociovaného viru (Liu *et al.*, 2014). Podobný efekt by mohla přinést i kovalentní modifikace VP3 u pseudovirionů odvozených od MPyV.

### 2.3.5 FSW

PTD, která je v této práci označována jako FSW, pochází z proteinové sekvence kapsidového proteinu VI od adenoviru. N-koncová alfa-helikální amfipatická oblast proteinu

VI, je esenciální pro únik adenovirové částice z endozomálního kompartmentu a slouží jako lytický faktor u adenoviru (Moyer *et al.*, 2011; Moyer a Nemerow, 2012; Wiethoff *et al.*, 2005). Mechanismus, jakým umožní protein únik částice z endozómu, není dosud úplně pochopen. Protein VI nevytváří v membráně pór, ale pravděpodobně narušuje stabilitu membrány endozómu tak, že indukuje pozitivní zakřivení membrány a její fragmentaci (Maier *et al.*, 2010). Za tento ohyb je zodpovědná již zmíněná tzv. FSW sekvence (úsek 33-55 AK proteinu VI) (Murayama *et al.*, 2016). Obdobně jako u adenovirů by tak mohla tato peptidová sekvence napomoci i částicím MPyV k úniku z endozómu.

### 3. Cíle

Polyomaviry jsou viry, jejichž virové kapsidy mohou být potenciálně využity jako teranostické nástroje nebo vektory pro genovou terapii.

Jako modelový virus se v naší laboratoři využívá myší polyomavirus (MPyV). Za účelem zvýšení účinnosti infekce částic MPyV a transdukce částic odvozených od MPyV se v laboratoři pokoušíme modifikovat tyto částice pomocí proteinů penetrujících membrány. Dosud byla pro modifikace virových částic využívána prostá inkubace částic s volným peptidem. Vlastnosti peptidů mohou umožnit snazší internalizaci částic do buňky nebo zvýšit pravděpodobnost úniku částic z endolysozomálního systému. Tato diplomová práce je součástí projektu, který se snaží tyto dvě možnosti analyzovat odděleně a ověřit tak hypotézu, že se vybrané CPP mohou angažovat právě v úniku z endocytického vezikulárního systému.

**Hlavním cílem této diplomové práce je zjistit, zda lze pomocí přímé (genetické) modifikace minoritního strukturního proteinu VP3 vybranými CPP, posílit předpokládanou viroporínovou funkci minoritních strukturních proteinů a zvýšit tak účinnost transdukce polyomavirových částic do lidských buněk.** Podle Rainey-Bargera *et al.* (2007) bylo zjištěno, že minoritní proteiny, které se nachází uvnitř virionu, se v jisté fázi transportu viru do jádra angažují v tvorbě membránových pórů, čímž napomáhají viru dostat se do cytoplazmy. To vysvětluje, proč jsou viriony s minoritními kapsidovými proteiny více infekční než viriony bez nich. Tato práce si proto navíc klade za cíl, přispět k tomuto zjištění přímou modifikací VP3 peptidem penetrujícím membrány.

Tato diplomová práce byla řešena v následujících dílčích krocích. Postupně bylo třeba:

- 1. Vyprodukovat a izolovat modifikované i nemodifikované virové částice (pseudoviriony) odvozené od MPyV obsahující plazmid s genem pro luciferázu.**
- 2. Charakterizovat izolované částice, tedy ověřit přítomnost a kvalitu proteinů. Ověřit přítomnost DNA uvnitř částic a zjistit celkové množství zabaleného reportérového plazmidu.**
- 3. Změřit účinnost transdukce modifikovaných částic a porovnat je s účinností transdukce částic nemodifikovaných.**

## 4. Materiál a metody

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Přístroje

Analytická váha Pioneer™ (Ohaus)

Blokový termostat Bio-TDB 100 (Biosan)

Elektroporátor Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad)

Fluorescenční mikroskop BX60 (Olympus)

Fluorometr Qubit (Invitrogen)

Inkubátor (LabTech)

Inkubátor CO<sub>2</sub> (Biotech)

Inkubátor CO<sub>2</sub> (Forma Scientific)

Inkubovaná třepačka TS-100C Thermo-Shaker (Biosan)

Laminární box (Esco)

Laminární box (Forma Scientific)

LightCycler R80 Real-TimePCR (Roche)

Magnetické míchadlo MST (VELP Scientifica)

Mastercycler epgradient S (Eppendorf)

Mikrocentrifuga MinisStar (VWR)

Mikrodestičkový spektrofotometr Epoch (BioTek)

pH metr S20 Seven Easy (Mettler Toledo)

Přístroj pro měření chemiluminiscence, bioluminiscence a UV fluorescence Fusion FX (Vilber)

Refraktometr ABBE (Carl Zeiss Jena)

Spektrofotometr ND-100 (NanoDrop Technologies)

Stolní centrifuga (MSE)

Stolní centrifuga GS-15R (Beckman)

Stolní centrifuga Microfuge® 16 (Beckman)

Stolní centrifuga Microfuge® R (Beckman)

Stolní centrifuga Universal 320 R (Hettich)

Světelný mikroskop (Carl Zeiss Jena)

Světelný mikroskop LEICA Dmi1 (Leica)

Termoblok CH-100 (Biosan)

Thermo Scientific Varioskan® Flash (Thermo Fisher Scientific)  
Transiluminátor Electronic DualLight™ (Ultra Lum Inc)  
Transmisní elektronový mikroskop JOEL-1011 vybavený CCD kamerou Veleta s akvizičním softwarem (Olympus Soft Imaging Solution BmbH)  
Třepačka Duomax 1030 (Heidolph)  
Třepačka pro kultivaci Orbital Shaker Incubator (Forma Scientific)  
Třepačka Shaker 30 (Labnet)  
Ultracentrifuga Optima L-90K (Beckman)  
Váha 440-33 (Kern)  
Vodní lázeň SUB (Grant)  
Vortex (VELP Scientifica)  
Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)  
Zdroj PowerPac Basic™ (Bio-Rad)

#### **4.1.2 Laboratorní vybavení**

Aparatura pro agarózovou elektroforézu (Cleaver Scientific)  
Aparatura pro přenášení proteinů na membránu (Bio-Rad)  
Aparatura pro SDS-PAGE (Bio-Rad)  
Bílé destičky 96F Nunclon Delta Microwell SI (Thermo Fisher Scientific)  
Bürkerova komůrka (Meopta)  
Číré 96-jamkové destičky (Gama Group)  
Dialyzační membrány (Serva)  
Elektroporační kyveta Gene Pulser® (Bio-Rad)  
Krycí sklíčka; průměr 12 mm (VWR)  
LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, bílá (Roche)  
Měděné sítě s uhlíkovou vrstvou (Electron Microscopy Sciences)  
Nástroj na rozdělování frakcí (Beckman)  
Nitrocelulózové membrány 0,45 µm; 300 mm x 4 mm (Amersham)  
Papíry Whatman™ (GE Healthcare Life Sciences)  
Parafilm (Bemis)  
Petriho misky pro bakteriální kultury (Gama Group)  
Petriho misky pro tkáňové kultury (TPP)  
Rotilabo®-filtry do injekční stříkačky; CME; velikost pórů 0,22 µm, průměr 33 mm (Carl Roth)

Ultracentrifugační kyvety (Beckman)

### **4.1.3 Software**

Fusion FX software (Vilber) - Software pro vyhodnocování a upravování snímků pořízených na přístroji Fusion FX (Vilber).

GraphPad Prism 8 - Software pro statistické zpracování dat a pro tvorbu grafů.

ImageJ - Software pro měření velikosti virových částic ze snímků pořízených na transmisním elektronovém mikroskopu.

iTAM 5.1 (Olympus soft imaging solutions GmbH) - Software pro zaznamenání a zpracování snímků pořízených na transmisním elektronovém mikroskopu.

LightCycler® 480 SW 1.5.1 (Roche) - Software pro zaznamenání a zpracování kvantitativní PCR.

RStudio - Software pro statistické zpracování dat.

SnapGene Viewer (SnapGene) - Software k prohlížení map plazmidů.

### **4.1.4 Chemikálie**

96% Ethanol (Lachema)

Agaróza (Amreco)

Demineralizovaná a filtrovaná voda ( $\text{demiH}_2\text{O}$ )

Destilovaná voda ( $\text{dH}_2\text{O}$ )

Dithiotreitol (Sigma)

DMSO (Sigma-Aldrich)

Fenol (Lachema)

Chlorid cesný ( $\text{CsCl}$ ) (Serva)

Chloroform (Lachema)

Izoamylalkohol (Lachema)

Izopropanol (Lachema)

Kyselina fosfo-wolframová (Agar Scientific; R1213)

Kyselina octová (Penta)

Kyselina p-kumarová (Sigma-Aldrich)

Luminol (Sigma-Aldrich)

Methanol (Lachema)

Octan sodný (Merck)

Peroxid vodíku (Penta)

Tetrachlorethylen (Penta)

#### 4.1.5 Používané roztoky

3M octan sodný (pH = 5,2) rozpuštěný v dH<sub>2</sub>O

- Pro získání cílového pH roztoku byla použita kyselina octová (Penta).

1M Tris-HCl

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Serva) rozpuštěný v dH<sub>2</sub>O

- Pro získání cílového pH roztoku byla použita HCl (Lancher).

PBS (pH = 7,4)

- 137mM NaCl (Lachner)
- 2,7mM KCl (Lachema)
- 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Penta)
- 1,8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Lachner)

Pufr B

- 10mM Tris-HCl, pH = 7.4 (Serva)
- 150mM NaCl (Lachner)
- 0,01mM CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich)

0,5M EDTA (pH = 8,0)

- Na<sub>2</sub>EDTA×H<sub>2</sub>O (EDTA = Ethylenndiamintetraoctová kyselina (Serva) rozpuštěná v dH<sub>2</sub>O

- Pro získání cílového pH roztoku byl použit NaOH (Sigma-Aldrich).

0,5x TBE pufr

- 45mM Tris-HCl (pH = 8,0) (Serva)
- 45mM kyselina boritá (Serva)
- 1mM EDTA-NaOH, pH 8,0 (Serva)

5x Laemmli vzorkovací pufr (Sigma-Aldrich)

- 5% SDS
- 50mM Tris-HCl (pH = 6,8)
- 50% (v/v) glycerol
- 25% merkptoethanol
- 0,005% (w/v) bromofenolová modř

- skladován při -20 °C

Versen

- 0,25% EDTA v PBS

## Trypsin

- 0,25% Trypsin v PBS

## 1x „Running“ pufr (pH = 8)

- 25mM Tris (Serva)
- 192mM glycine
- 1% SDS (Sigma-Aldrich)

## 1x „Blotovací“ pufr (pH = 8,3)

- 25mM Tris (Serva)
- 195mM glycine
- 20% methanol

## 10x Inkubační pufr

- 400mM Tris-HCl (pH = 7,9) (Serva)
- 100mM NaCl (Lachner)
- 30mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich)
- 10mM CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich)

Pufr pro restriční štěpení - Tango (Thermo Fisher Scientific)

## 4.1.6 Antibiotika

Ampicilin (Biomedika), finální koncentrace 100 µg/mL

Hygromycin B Gold (Invitrogen), finální koncentrace 0,4 mg/mL

Zeocin<sup>TM</sup> (InvivoGen), finální koncentrace 2 mg/mL

## 4.1.7 Protilátky

### Primární protilátky

Anti-VP1 („D4“) - myší monoklonální IgG protilátka proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 MPyV (připravena RNDr. Alenou Drda Morávkovou, MBA, Ph.D.)

Anti-VP1 („Anglie“) - myší monoklonální IgG protilátka proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 (Forstová *et al.*, 1993)

Anti-VP2/3 („1A2“) - myší monoklonální IgG protilátka proti minoritním kapsidovým nativním proteinům VP2 a VP3 (připravena v laboratoři virologie)

Anti-VP2/3 („2C8“) - myší monoklonální IgG protilátka proti minoritním kapsidovým denaturovaným proteinům VP2 a VP3 (Forstová *et al.*, 1993)

### Sekundární protilátky

Kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou, pro imunobarvení ředěno 1:1000 (Bio-Rad)



### 4.1.8 Enzymy

DNáza I (Roche)

DNáza TURBO (Thermo Fisher Scientific)

RNáza A/T1 (Thermo Fisher Scientific)

Trypsin (Sigma-Aldrich)

Restrikční enzymy - BamHI, HindIII, NotI, MluI, NruI a SphI (Thermo Fisher Scientific)

Proteináza K (Serva)

### 4.1.9 Vektory

#### 4.1.9.1 Reportérový plazmid

**pGL3-control [5 256 bp]** - Jedná se o expresní vektor plazmidového typu. Obsahuje gen pro luciferázu a gen pro ampicilinovou rezistenci, beta-laktamázu. Plazmid dále má fl bakteriofágový počátek replikace (ori), syntetický poly(A) signál, signál pro RNA polymerázu II lidského genu alfa2-globinu pro zastavení transkripce, SV40 promotor, SV40 ori, SV40 poly(A) signál a AmpR promotor. (Promega)

#### 4.1.9.2 Pomocné plazmidy

**pEF1-LATE [~7 500 bp]** - Je expresní vektor plazmidového typu derivovaný z pEF1/myc-His (Clontech). pEF1-LATE byl připravený RNDr. Lenkou Horníkovou, Ph.D. v laboratoři virologie a obsahuje geny VP1, VP2 a VP3 myšího polyomaviru pod promotorem lidského elongačního faktoru 1 alfa (EF-1a). Dále obsahuje gen pro ampicilinovou rezistenci.

**pwP-plazmidy [~6 493 bp]** - Vychází z expresního vektoru plazmidového typu, pwP. Původní pwP (<https://www.addgene.org/22519/>) obsahuje rekombinační oblast pro Gateway® BP reakci, gen pro MPyV VP1 pod EF-1a promotorem EGFP pod kontrolou SV40 promotoru, SV40 ori, SV40 poly(A) signál, Kozakové sekvenci, posttranskripční regulační element viru sviští hepatitidy, EF-1a poly(A) signál, T7 promotor a syntetický bakteriální EM7 promotor pro gen zeocinové rezistence. V plazmidu byla sekvence ATG genu EGFP, umístěná za SV40 promotorem, mutována RNDr. Lenkou Horníkovou, Ph.D. tak, aby před EGFP vznikla nová restrikční místa MluI a NruI. Gen EGFP byl restrikčně deletován enzymy MluI a NotI. Namísto EGFP byla vložena jedna modifikovaná sekvence genu pro VP3 s příslušnou sekvencí pro peptid penetrující membrány. Tyto syntetické sekvence modifikovaného VP3 byly restrikčně vystřiženy enzymy MluI a NotI z nosiče plazmidu pMA-T (Invitrogen). Finální pwP-plazmidy (pwP\_VP3-R8, pwP\_R8-tVP3, pwP\_VP3-LAH4,

pwP\_tVP3-LAH4R, pwP\_LAH4-tVP3, pwP\_FSW-tVP3) obsahují gen pro VP1 a pro modifikovaný VP3, anebo pouze VP1, kde nebyl vložen žádný další gen (pwP-ΔGFP).

**pH2-VP1 [7 854 bp]** - Je expresní vektor plazmidového typu připravený RNDr. Hanou Španielovou, Ph.D. v laboratoři virologie. Plazmid obsahuje gen pro MPyV VP1 pod SV40 promotorem a promotorem lidského elongační faktoru 1 alfa (EF-1a). Také obsahuje gen pro VP2 pod zkráceným EF-1a promotorem. Dále má SV40 ori, posttranskripční regulační element viru svištlí hepatitidy, EM7 promotor, T7 promotor, dvě sekvence pro EF-1a poly(A) signál a zkrácenou sekvenci LTR viru HTLV-1.

#### 4.1.10 Modifikované virové proteiny

DNA sekvence modifikovaného VP3 byly navrženy RNDr. Hanou Španielovou, Ph.D. a syntetizovány na zakázku společností Thermo Fisher Scientific. Sekvence byly navrženy s unikátní MluI a NruI oblastí na začátku spolu se SphI a NotI oblastí na konci. Syntetické geny byly získány jako součást plazmidového nosiče pMA-T (Invitrogen).

Aminokyselinové sekvence navržených VP3 s CPP jsou vypsány níže. Světle modře je vyznačena sekvence, která byla upravena za účelem vzniku restriční místa pro KpnI. Zároveň před tuto sekvenci byly vkládány některé peptidy. Žlutě značené je vazebné místo pro VP1. Zeleně je značen jaderný lokalizační signál. Růžově je značen linker mezi peptidem a C-koncem VP3. Sekvence peptidu penetrujícího membrány je vypsána červeným textem.

##### Původní aminokyselinová sekvence VP3 MPyV

MALIPWRDPALLDIYFPGVNQFAHALNVVHWDWGHGLLHLSVGRYVWQMVVQETQHRLEGAVRELTVRQTHTFLD  
GLARLLENTRWVVSNAQSAIDAINRGASSVSSGYSSLSDYRQLGLNPPQRRALFNRIEGSMGNGGPTPAAHIQDE  
SGEVIKFYQAPGGAHQRVTPDWMLPLILGLYGDITPTWATVIEEDGPQKKKRRRL

##### VP3-R8

MALIPWRDPALLDIYFPGVNQFAHALNVVHWDWGHGLLHLSVGRYVWQMVVQETQHRLEGAVRELTVRQTHTFLD  
GLARLLENTRWVVSNAQSAIDAINRGASSVSSGYSSLSDYRQLGLNPPQRRALFNRIEGSMGNGGPTPAAHIQDE  
SGEVIKFYQAPGGAHQRVTPDWMLPLILGLYGDITPTWATVIEEDGPQKKKRRRLRRRRRRRC

##### VP3-LAH4

MALIPWRDPALLDIYFPGVNQFAHALNVVHWDWGHGLLHLSVGRYVWQMVVQETQHRLEGAVRELTVRQTHTFLD  
GLARLLENTRWVVSNAQSAIDAINRGASSVSSGYSSLSDYRQLGLNPPQRRALFNRIEGSMGNGGPTPAAHIQDE  
SGEVIKFYQAPGGAHQRVTPDWMLPLILGLYGDITPTWATVIEEDGPQKKKRRRLGGGSGGGGTKKALLALALHH  
LAHLALHLALALKKA

##### R8-tVP3 (zkráceno o prvních 99 AK)

RRRRRRRRRCGGGSGGGTYSSLSDYRQLGLNPPQRRALFNRIEGSMGNGGPTPAAHIQDESGEVIKFYQAPGGAH  
QRVTPDWMLPLILGLYGDITPTWATVIEEDGPQKKKRRRL

#### LAH4-tVP3 (zkráceno o prvních 99 AK)

KKALLALALHHLAHLALHLALALKKA GGGSGGGT YSSLSDYYRQLGLNPPQRRALFNRIEGSMGNGGPTAAHIQ  
DESGE VIKFYQAPGGAHQRVTPDWMLPLILGL YGDITPTWATVI EEDGPQKKKRRL

#### tVP3-LAH4R (zkráceno o prvních 99 AK; sekvence peptidu LAH4 je invertovaná)

MGASSVSSGYSSLSDYYRQLGLNPPQRRALFNRIEGSMGNGGPTAAHIQDESGE VIKFYQAPGGAHQRVTPDWML  
PLILGL YGDITPTWATVI EEDGPQKKKRRL GGGSGGGT AKKLALALHLALHALHHLALALLAKK

#### FSW-tVP3 (zkráceno o prvních 99 AK)

MFSWGLWSGIKNFGSTVKNY GGGSGGGT YSSLSDYYRQLGLNPPQRRALFNRIEGSMGNGGPTAAHIQDESGE V  
IKFYQAPGGAHQRVTPDWMLPLILGL YGDITPTWATVI EEDGPQKKKRRL

### 4.1.11 Primery

- Fluc\_qPCR\_fw2 (KRD): 5'-ATTACCAGGGATTTTCAGTCGATGT-3'

- použit pro absolutní kvantifikaci plazmidu pGL3-control

T<sub>m</sub> = 55 °C

- Fluc\_qPCR\_rev2 (KRD): 5'-ATCAGTGCAATTGTCTTGTCCCTA-3'

- použit pro absolutní kvantifikaci plazmidu pGL3-control

T<sub>m</sub> = 55 °C

### 4.1.12 Kultivační media

SOC médium - Super Optimální bujón s Katabolickým represorem

- 0,5 % (w/v) kvasničný extrakt (Imuna)
- 2 % (w/v) pepton (Imuna)
- 20mM glukóza (Serva)
- 10mM NaCl (Sigma-Aldrich)
- 2,5mM KCl (Lachema)
- 10mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich)
- 10mM MgSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich)

- MgCl<sub>2</sub> a MgSO<sub>4</sub> byly připraveny zvlášť a přidány před použitím média

LB médium (Luria-Bertani médium)

- 1 % (w/v) Trypton (Biolife)
- 0,5 % (w/v) Kvasničného lyzátu (Biolife)
- 1 % (w/v) NaCl (Lachner)

Živný agar N° 2 (Biolife)

- 1 % (w/v) Pepton
- 1 % (w/v) Kvasničný lyzát
- 0,5 % (w/v) NaCl

- 1,5 % (w/v) Agar

DMEM (Sigma Life Science) - Dulbecco modifikované Eagle médium s vysokým obsahem glukózy

- 4500 mg/L D-glukózy
- L-glutamin
- Pyruvát sodný
- Bikarbonát sodný

- Médium bylo dodatečně obohaceno o 100x koncentrované neesenciální aminokyseliny MEM NEAA (Gibco), tak aby MEM NEAA byl ve výsledku 1x koncentrovaný.

- Kromě DMEM bez séra byla současně vytvořena varianta DMEM se sérem (tzv. kompletní médium), kdy se do DMEM přidalo 1/10 objemu fetálního bovinního séra (Gibco)

Čiré DMEM (Gibco) - Dulbecco modifikované Eagle médium

- 4500 mg/L D-glukózy
- L-glutamin
- 25mM HEPES
- Bez pyruvátu sodného

- Dodatečně byl přidán pyruvát a 100x koncentrované neesenciální aminokyseliny MEM NEAA (Gibco), tak aby MEM NEAA byl ve výsledku 1x koncentrovaný.

- Zároveň se do čirého DMEM přidalo 1/10 objemu fetálního bovinního séra (Gibco)

#### **4.1.13 Bakteriální kmeny a buněčné linie a viry**

Kompetentní bakterie *Escherichia coli* TOP10 - Genotyp: *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZAM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*

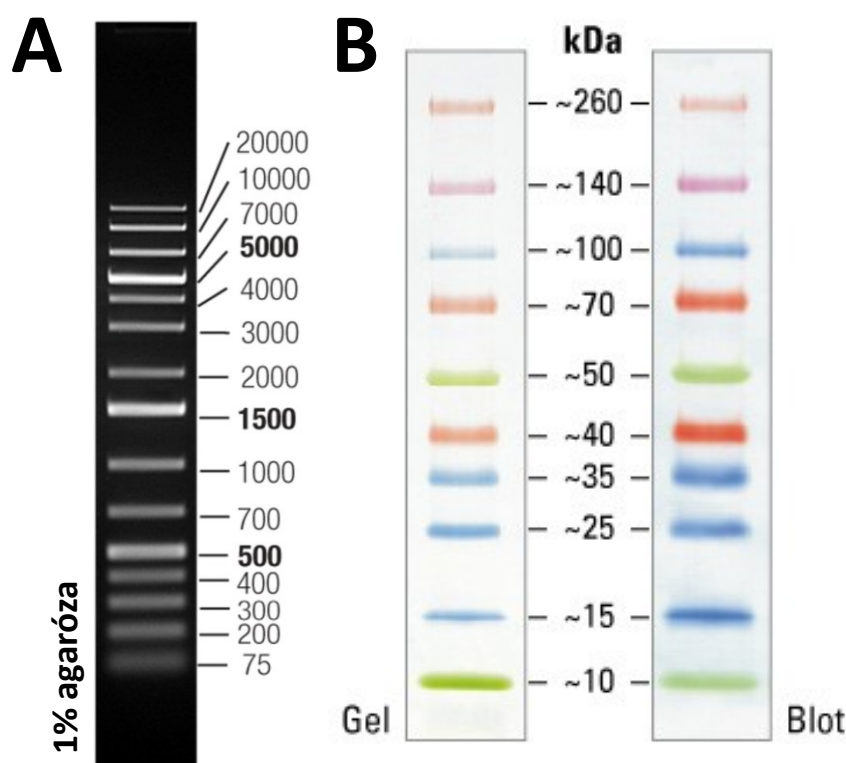
Lidské embryonální ledvinové buňky 293TT - Transformovaná buněčná linie produkující velký T antigen viru SV40, který je vhodný pro expresi rekombinantních proteinů (Buck *et al.*, 2004).

MPyV kmen BG (GenBank AF442959)

#### **4.1.14 Markery molekulových hmotností**

Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) - Molekulární DNA marker pro agarózovou elektroforézu (viz obrázek 6A)

Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) - Molekulární proteinový marker pro SDS-PAGE (viz obrázek 6B)



**Obrázek 6: Molekulární markery** - DNA marker Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) (A); Proteinový marker Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) (B)

#### 4.1.15 Komerční soupravy a produkty

12% Mini-PROTEAN® TGX™ gel, 12 jamek, 20 µl (Bio-Rad)

CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega)

DPBS (Lonza) - Dulbecco fyziologický roztok pufrovaný fosfátem; sterilní a filtrovaný

Endotoxin-free Plasmid Purifikation Kit (JETstar)

GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)

Imperial™ Protein Stain (Thermo Fisher Scientific)

iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad)

Midori Green Stain Gel (Nippon Genetics)

Qubit™ Protein Assay kit (Invitrogen)

Sso-Advanced Universal Sybr Green Supermix (Bio-Rad)

SYPRO® Ruby Protein Stain (Invitrogen)

Transfekční činidlo Turbofect (Thermo Fisher Scientific)

Triton X-100 (Serva)

6x DNA Gel Loading Dye (Fermentas)

Luciferázový kit Bright Glo™ (Promega)

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Sterilizace

Pro sterilizaci médií, roztoků, špiček a mikrozkmavek se využil autokláv. Sterilizace v autoklávu probíhala při 127 °C, 120 kPa po dobu 30 minut. Laboratorní sklo bylo sterilizováno horkým vzduchem při 160 °C po dobu 3 hodin. Roztoky, které nebylo možné sterilizovat v autoklávu byly před použitím filtrovány přes filtr s póry o velikosti 0,22 µm.

### 4.2.2 Práce s bakteriálními kmeny

#### 4.2.2.1 Propagace a izolace plazmidů

Pro potřeby generování pseudovirionů bylo nutné získat dostatečné množství pomocných (tj. plazmidů kódujících kapsidové proteiny) a reportérových plazmidů. Tyto plazmidy proto byly inkorporovány do kompetentních bakterií *E. coli* TOP10. Vložení plazmidu proběhlo metodou elektroporace. Nejprve se k 50 µL bakteriální suspenze přidal 1 µL (1 až 1 500 ng DNA) plazmidu. Směs se nechala 1 minutu inkubovat na ledu, a poté se přenesla do elektroporační kyvety Gene Pulser® (Bio-Rad) s průměrem 2 mm. Kyveta se poté vložila do elektroporátoru Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad). Impuls (25 µF; 2,5 kV; 200 Ω) trval přesně 5 ms. Ihned poté se k suspenzi přidal 1 mL SOC média. Tato směs se přenesla do sterilních 100mL Erlenmayerových baněk. Baňky se inkubovaly na třepačce při 200 ot./min, 37 °C, 1 hodinu.

Následně byly bakterie naředěny v poměru 1:10 a 1:100 ve 100 µL SOC média. Obě směsi byly nanесeny na agarové plotny s přidaným příslušným selekčním antibiotikem (ampicilin, nebo zeocin). Zbývající suspenze bakterií byla centrifugována při 5 000x g, 5 min. Supernatant se slil přetočením mikrozkmavky a zůstatek ve zkumavce (pelet + SOC médium) byl posléze nanесen na agarové plotny se selekčním antibiotikem. Plotny byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin.

Pokud kolonie vyrostly na selekční agarové plotně, byla odebrána jedna kolonie, která byla vložena do 200 mL LB média se stejným selekčním antibiotikem a inkubována na třepačce při 200 ot./min, 37 °C po dobu 16 hodin. Poté byla suspenze centrifugována při 12 000x g, 3 min při 4 °C. Z peletu se izoloval příslušný plazmid pomocí komerční soupravy Endotoxin-free Plasmid Purification Kit (JETstar). U získaného plazmidu byla změřena koncentrace DNA na spektrofotometru ND-100 (NanoDrop Technologies) a vzorek byl zamražen při -20 °C. Izolovaný plazmid byl podroben další charakterizaci a následně použit v transfekci 293TT buněk.

## **4.2.3 Práce s tkáňovými kulturami**

### **4.2.3.1 Pasážování buněčné linie 293TT**

K pasážování buněk se přistoupilo vždy jakmile buňky dosáhly tzv. konfluence, tedy stavu, kdy celkový povrch Petriho misky pro tkáňové kultury (TPP) byl rovnoměrně posetý buňkami. Konfluence se ověřovala pomocí světelného mikroskopu. Buňky 293TT se pasážovaly v průměru každé 3-4 dny. Při pasážování byly buňky resuspendovány v kompletním médiu (DMEM + 10% sérum) vždy v takovém poměru, aby opět dosáhly konfluence za další 3-4 dny. Postup pasážování buněk začal odsátím média z misky, která obsahuje konfluentně narostlé buňky. K buňkám se poté přidal versen k vychytání dvojmocných iontů. V případě misek o průměru 6 mm se přidával 1 mL versenu a v případě misek o průměru 10 mm se přidávalo 2,5 mL versenu. Ihned po přidání byl versen odsát. Na buňky se přidal trypsin, který degradoval adherentní povrchové proteiny buněk, díky čemu se buňky pustily od povrchu. 0,5 mL trypsinu bylo použito na 6mm misku a 1 mL trypsinu bylo použito na 10mm misku. Buňky s trypsinem se nechaly inkubovat 5 minut při 37 °C s 5% CO<sub>2</sub>. Poté se buňky resuspendovaly v kompletním médiu v potřebném poměru. Celkový objem suspenze činil pro 6mm misky 5 mL a pro 10mm misky 10 mL. Na závěr se k buňkám přidal Hygromycin B Gold o finální koncentraci 0,4 mg/mL.

### **4.2.3.2 Ko-transfekce buněk 293TT pomocným a reportérovým plazmidem**

Za účelem vyprodukování modifikovaných virových částic, které by zároveň obsahovaly reportérový plazmid s genem pro luciferázu, bylo třeba transfekci vybranými plazmidy provést simultánně. Na produktivní buněčnou linii 293TT se proto nanášel jeden, nebo dva plazmidy obsahující geny pro tvorbu daných strukturních virových proteinů spolu s reportérovým plazmidem.

Před samotnou transfekcí bylo nutné buňky pasážovat (viz kapitola 4.2.3.1). Avšak na rozdíl od pasážování byly buňky pro transfekci resuspendovány v kompletním médiu bez přidaného Hygromycinu B Gold. Jakmile buňky dosáhly 60% konfluence, byla provedena jejich transfekce. Transfekční směs určená pro jednu 6mm misku buněk se skládala z 600 µL DMEM bez séra, 6 µg DNA (pomocný plazmid a reportérový plazmid v poměru 1:1, nebo dva pomocné plazmidy a reportérový plazmid v poměru 1:1:1) a 12 µL transfekčního činidla Turbofect (Thermo Fisher Scientific). Transfekční činidlo bylo do směsi přidáno až jako poslední. Směs se pak řádně promíchala pomocí vortexu a nechala inkubovat 15 minut při laboratorní teplotě. Potom se transfekční směs nakapala ve vzoru spirály na misku s buňkami. Buňky se vložily do inkubátoru s teplotou 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> na 48 hodin. Po dvou dnech se

transfekované buňky mechanicky seškrábly z Petriho misky. Suspense transfekovaných buňek se následně centrifugovala při 2 000x g, 5 minut. Médium se odstranilo a pelet se promyl pomocí PBS. Směs se pak opět centrifugovala při 2 000x g, 5 minut. Supernatant se odstranil a pelet zamrazil při -20 °C. Dalším postupem bylo z peletu izolovat pseudoviriony.

#### **4.2.3.3 Pseudoinfekce buněk pseudoviriony**

293TT buňky bylo nejprve třeba pasážovat (viz kapitola 4.2.3.1). Buňky rostoucí na Petriho miskách byly po opláchnutí versenem a po inkubaci s trypsinem resuspendovány v kompletním médiu, převedeny do suspenze a spočítány pomocí Bürkerovy počítací komůrky. Buňky se naředily kompletním čirým médiem (čiré DMEM + 10% sérum) a po 100 µL se nanasly na čirou 96-jamkovou destičku (Gama Group) tak, aby výsledná koncentrace buněk vždy činila 40 000 b./jamku. Do 2 jamek na destičce bylo místo buněk nanaseno 100 µL čirého DMEM bez séra sloužící jako „blank“. Destička s buňkami se inkubovala 3 hodiny v inkubátoru o teplotě 37 °C s 5% CO<sub>2</sub>. Poté se buňky pseudoinfikovaly (transdukovaly) pseudoviriony.

Mezitím se pseudoviriony naředily kompletním čirým médiem tak, aby všechny vzorky obsahovaly stejné množství DNA ( $m = 1,14$  ng). Následně se částice ošetřily DNázou I (viz kapitola 4.2.7.2). Po ošetření se pseudoviriony nanášely po 100 µL na jamku. Pro každou variantu částic byl připraven heptaplikát. Zbylé jamky s buňkami sloužily jako negativní kontrola (NK). Místo částic se k NK přidalo 100 µL kompletního čirého média. Do jamek určených jako „blank“ se nic nepřidávalo. Pseudoinfekce probíhala 72 hodin při 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> v prostředí o zvýšené vlhkosti. Po pseudoinfekci byl proveden test životaschopnosti buněk, pro který byly vyhrazeny tři jamky z původního heptaplikátu, a luciferázový test, pro který byly vyhrazeny čtyři jamky z původního heptaplikátu.

#### **4.2.3.4 Test životaschopnosti buněk po pseudoinfekci**

Měření životaschopnosti buněk bylo provedeno pomocí kitu CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Pro měření bylo třeba, aby se buňky 293TT po pseudoinfekci na desce nejprve centrifugovaly při 300x g, 25 °C, 5 minut. Pro měření pomocí tohoto kitu bylo třeba mít ve vyhrazených třech jamkách z původního heptaplikátu každého vzorku objem 100 µL. Nadbytečné médium bylo proto odebráno. Dodatečně se použily tři jamky NK pro přípravu pozitivní kontroly. U těchto jamek bylo odebráno 120 µL média (z původních 200 µL), a poté přidáno 20 µL 2,5% Tritonu X-100, který je vysoce cytotoxický. Následně se do vyhrazených jamek přidalo 20 µL CellTiter 96® činidla obsahující metabolický substrát, tetrazoliovou sůl (MTS). Buňky se s činidlem inkubovaly při



37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 2 hodiny. Životaschopné buňky metabolicky mění MTS na formazan. Množství formazanu lze změřit při vlnové délce 490 nm. Síla detekovaného signálu je pak přímo úměrná množství životaschopných buněk. Po inkubaci se destička vložila do spektrofotometru Epoch (BioTek), kde se při vlnové délce 490 nm kolorimetricky změřila míra životaschopnosti buněk. Destička se po měření zmrazila při -20 °C.

#### **4.2.3.5 Luciferázový test**

Po otestování životaschopnosti buněk byla destička s buňkami 3x zmrazena a rozmrazena, aby došlo k destrukci buněk. Buňky v jamkách byly dodatečně homogenizovány třením špičky o dno jamky, alespoň po dobu 30 sekund. 100 µL buněčné suspenze bylo poté převedeno do jamek bílé 96-jamkové destičky (Thermo Fisher Scientific), která byla určena pro luciferázový test. Pracovalo se v tetraplikátech. Do jamek se vzorky se přidalo 100 µL reakčního substrátu obsahujícího luciferin (Promega), s kterým se vzorky inkubovaly při laboratorní teplotě 3 minuty. Ihned po uplynutí doby inkubace se destička vložila do přístroje Thermo Scientific Varioskan® Flash (Thermo Fisher Scientific), kde se změřil luciferázový signál vzorků.

Výstupem tohoto testu byla změřená míra bioluminiscence. Bioluminiscence vznikla interakcí substrátu luciferinu s enzymem luciferázou, který byl do buněk transdukován ve formě genu prostřednictvím modifikovaných i nemodifikovaných pseudovirionů odvozených od MPyV. Míra bioluminiscence tak byla přímo úměrná množství produkovaného enzymu v infikovaných buňkách. Buňky byly před měřením lyzovány opakovaným zmražením a rozmražením, aby se docílilo kontaktu luciferázy s luciferinem.

Naměřené hodnoty tetraplikátů byly posléze zprůměrovány. V případě že byla naměřená hodnota některého replikátu záporná, anebo o více jak 2 řády odlehlá než průměr zbylých replikátů, byl takový replikát z průměru vyřazen. Naměřené hodnoty bioluminiscence byly dodatečně normalizovány podle životaschopnosti buněk po pseudoinfekci.

#### **4.2.4 Izolace pseudovironů**

##### **4.2.4.1 Ultracentrifugace v CsCl gradientu**

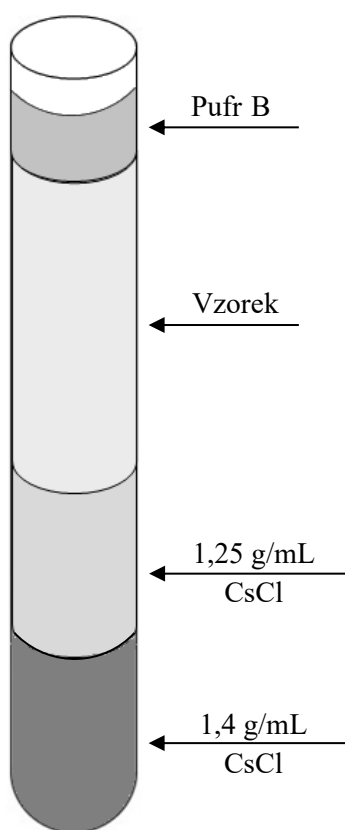
Zamražené buněčné pelety po transfekci se nejprve nechaly rozmrazit při pokojové teplotě. Poté se k peletu přidalo DPBS (Lonza), nebo Pufr B tak, aby suspenze činila ve výsledku 5 mL. K suspenzi se přidalo 5 mL tetrachlorethylenu (Penta) a směs se silně protřepala. Tetrachlorethylen sloužil k rozrušení buněčných membrán a k oddělení buněčných složek od virionů. Dále se směs centrifugovala ve stolní centrifuze GS 15R (Beckman) při

4 800 ot./min; 30 minut; 4 °C. Poté se opatrně odebrala vzniklá horní vodná fáze obsahující virové částice. Vypreparovaná fáze se znovu centrifugovala při 4 800 ot./min; 20 minut; 4 °C. Mezitím se ultracentrifugační kyvety (Beckman) pro rotor SW41 předvrstvily dvěma vrstvami CsCl. Nejprve se do kyvety přidalo 2,5 mL 1,4 g/mL CsCl v pufru B. Následovalo opatrné pipetování 2,5 mL 1,25 g/mL CsCl v pufru B těsně nad hladinu koncentrovanějšího roztoku CsCl. Obdobným způsobem se poté nanese vzorek částic nad hladinu méně koncentrovaného roztoku CsCl. Nakonec se přidával pufr B tak, aby hladina sahala 2 mm pod svrchní okraj kyvety. Umístění roztoků v kyvetě je znázorněno na obrázku č. 6. Ultracentrifugace byla zajištěna přístrojem Ultracentrifuga Optima L-90K (Beckman), kde se vzorky centrifugovaly při 35 000 ot./min (rotor SW41); 2,5 hodiny; 4 °C v ustáleném vakuu.

Po centrifugaci se gradient rozdělil na 12, nebo 16 frakcí pomocí nástroje na rozdělávání frakcí (Beckman). Pro každou frakci byl změřen refraktometrický index a byla provedena metoda dot blot pro identifikaci virových proteinů (viz kapitola 4.2.8.1). Na základě získaných dat se vybrané frakce sjednotily do tzv. frakčních skupin. Pro takto sjednocené frakce byla následně provedena dialýza.

#### **4.2.4.2 Dialýza frakčních skupin**

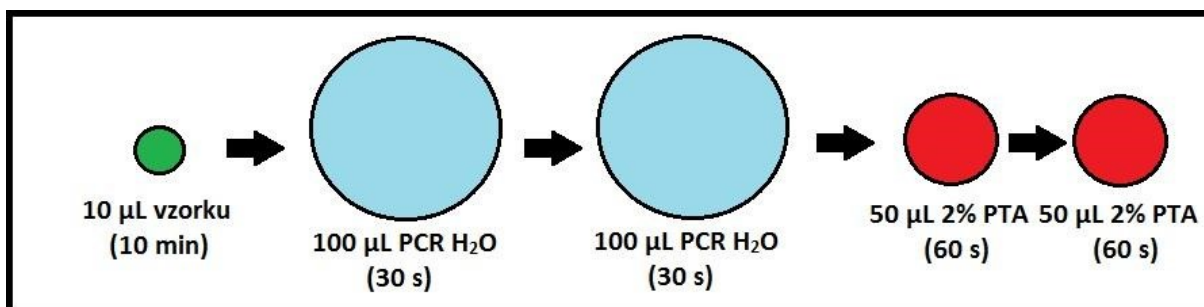
Sjednocené frakce bylo třeba zbavit CsCl solí. Každá jednotlivá frakční skupina se proto nanese do dialyzačních membrán (Serva). Tyto membrány se nejprve povařily ve vroucí destilované vodě 10 minut, až poté bylo možné do nich pipetovat vzorky. Po přidání vzorků do dialyzačních membrán, se membrána ponořila do nádoby s 1 500 ml pufrem B. Vzorky byly dialyzovány nejprve 30 minut při pokojové teplotě za stálého míchání. Poté se membrána přendala do nové nádoby s čerstvým pufrem B (opět 1 500 mL), kde se nechaly vzorky dialyzovat přes noc při 4 °C, opět na magnetickém míchadle. Obsah membrán se po dialýze odebral do mikrozkupek, a poté zamrazil při -20 °C.



**Obrázek 7:** Schématické rozložení roztoků v ultracentrifugační kyvetě pro potřeby ultracentrifugace izolátů virových částic - Roztoky se nanášely směrem zespoda nahoru

#### 4.2.5 Práce s transmisním elektronovým mikroskopem

Za účelem přímé detekce virových částic po izolaci v CsCl gradientu posloužilo negativní barvení vzorků pro zobrazení na transmisním elektronovém mikroskopu (TEM). Postupovalo se podle schématu níže (viz obrázek 8). Nejprve se připravil nesmáčivý povrch, v tomto případě parafilm. Na ten se nakapalo v řadě 10  $\mu\text{L}$  vzorku, 2x 100  $\mu\text{L}$  demiH<sub>2</sub>O, 2x 50  $\mu\text{L}$  2% fosfo-wolframové kyseliny (PTA). Měděná síťka potažená vrstvou uhlíku se poté opatrně položila stranou s uhlíkovou vrstvou na kapku vzorku. Po 10 minutách se síťka pinzetou přemístila na kapku s demiH<sub>2</sub>O. Po 30 sekundách se přenesla na druhou kapku s demiH<sub>2</sub>O. Následně se po 30 sekundách síťka inkubovala s PTA po dobu 60 sekund. Poté se síťka opět přemístila na další kapku s PTA na dalších 60 vteřin. Nakonec se obarvená síťka opatrně osušila filtračním papírem. Takto připravená síťka byla následně vložena do TEM, kde se přímo detekovaly virové částice.



**Obrázek 8: Schéma přípravy síťky pro detekci virových částic metodou negativního barvení v TEM** - Obdélník znázorňuje nesmáčivou plochu parafilmu. Zeleně je znázorněna kapka vybraného vzorku. Světle modře jsou znázorněny kapky demineralizované vody (demiH<sub>2</sub>O). Červené kruhy představují kapky 2% fosfo-wolframové kyseliny (PTA).

## 4.2.6 Manipulace s DNA

### 4.2.6.1 Štěpení DNA restrikčními enzymy

U plazmidů, které byly klonovány v bakteriích *E. coli* TOP10 a izolovány, byla ověřena jejich identita restrikčním štěpením. Restrikční směs byla připravena v mikrozkuhavce podle tabulky č. 1. Avšak koncentrace jednotlivých složek se mohla lišit podle nároků užitých enzymů. Směs se následně inkubovala 2 hodiny při 37 °C. Výběr restrikčních enzymů a pufru byl závislý na sekvenci konkrétního plazmidu a podle aktuální dostupnosti. Vzorek štěpeného plazmidu byl nanesen na 1% agarózový gel a podroben elektroforéze.

Složky reakční směsi (finální množství/koncentrace)
1x Restrikční enzym 1 (0,5 U)
1x Restrikční enzym 2 (0,5 U)
Pufr (1x koncentrovaný)
Plazmid (500 ng)
demiH <sub>2</sub> O (doplnit do 10 µL)

**Tabulka 1: Složení reakční směsi pro restrikční štěpení plazmidu** - Ke správné identifikaci plazmidu byly využity vždy alespoň 2 restrikční enzymy. Pufr byl vybrán dle preferencí používaných enzymů. Plazmid byl přidáván v množství 500 ng. Celkový objem reakční směsi byl 10 µL.

### 4.2.6.2 Agarózová elektroforéza

Součástí identifikace DNA byla agarózová elektroforéza. Nejprve se připravil 1% agarózový gel, kam se přidalo 1,75 µL DNA indikátoru Midori Green Stain Gel (Nippon Genetics). Gel se nechal ztuhnout, a poté se vložil do aparatury pro elektroforézu (Cleaver Scientific). Do aparátu s gelem se nalil 0,5x koncentrovaný TBE pufr. Mezitím se připravily vzorky DNA. 1-10 µL DNA se smíchalo se 2 µL 6x DNA Gel Loading Dye (Fermentas) a

směs se nanese na gel ponořený v TBE pufru v aparatuře společně s 3  $\mu\text{L}$  markeru molekulových hmotností Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Elektroforéza probíhala 30 minut při 80 V, 400 mA. Gel byl poté vyfotografován na přístroji pro měření UV fluorescence Fusion FX (Vilber).

#### **4.2.6.3 Ošetření DNA RNázou A/T1**

Část vzorku extrahované DNA z pseudovirionů byla za účelem zjištění přítomnosti RNA ošetřena RNázou A/T1 a analyzována pomocí agarózové elektroforézy. Pro 1,5  $\mu\text{L}$  DNA vzorku se přidalo 5  $\mu\text{L}$   $\text{demiH}_2\text{O}$  a 1  $\mu\text{L}$  RNázy A/T1 (finální koncentrace 0,27  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 0,67 U/ $\mu\text{L}$ ). Inkubace s RNázou A/T1 trvala 30 minut při 37 °C.

### **4.2.7 Manipulace s pseudoviriony**

#### **4.2.7.1 Ošetření částic DNázou TURBO**

Inkubace částic s DNázou TURBO (Thermo Fisher Scientific) posloužila k odstranění nadbytečné DNA, která se nezabalila do částic. DNA uvnitř částic byla před DNázou TURBO chráněna proteinovou kapsidou. K odstranění volné DNA byla použita komerční DNáza TURBO. Smíchalo se 17  $\mu\text{L}$  pseudovirionů (proteinová koncentrace ošetřovaných částic činila vždy 41,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) s 2  $\mu\text{L}$  10x TURBO DNázového pufru a s 1  $\mu\text{L}$  DNázy TURBO. Inkubace trvala 30 minut při 37 °C v termobloku (Biosan). Inaktivace DNázy TURBO byla zajištěna inaktivačním pufrem, jenž byl součástí komerční soupravy. Do směsi byly přidány 2  $\mu\text{L}$  inaktivačního pufru a směs se inkubovala 5 minut při laboratorní teplotě. Směs se poté centrifugovala 90 vteřin při 10 000x g. Odebral se supernatant bez porušení peletu. Takto ošetřené vzorky byly buď rovnou použity anebo zamrazeny při -20 °C. Takové vzorky částic byly dále používány při kvantitativní PCR (qPCR).

#### **4.2.7.2 Ošetření částic DNázou I**

Během přípravy částic k pseudoinfekci 293TT buněk, pro měření efektivity transdukce, byly vzorky nejprve naředěny tak, aby všechny vzorky obsahovaly stejné množství DNA. Částice byly posléze inkubovány s DNázou I (Roche). K naředěným pseudovirionům se přidala DNáza I (s finální koncentrací 0,02 U/ $\text{mL}$ ) a  $\text{MgCl}_2$  (s finální koncentrací 2,5 mM). Směs se inkubovala 30 minut při 37 °C. Následně byly ošetřené pseudoviriony použity k pseudoinfekci buněk 293TT. DNáza I nebyla inaktivována.

#### **4.2.7.3 Absolutní kvantifikace DNA via qPCR**

Metoda qPCR byla využita k změření kvantity reportérového plazmidu pGL3-control zabaleného v modifikovaných pseudovirionech. Vzorky byly vždy před qPCR naředěny na

stejnou proteinovou koncentrací ( $c = 41,1 \mu\text{g/mL}$ ), ošetřeny DNázou TURBO, a poté ještě naředěny 10x, 100x a 1 000x. Pro stanovení koncentrace reportérového plazmidu ve vzorcích pseudovirionů byla vytvořena desítková ředící řada tohoto plazmidu v rozmezí  $1,7 \times 10^9$  kopií/ $\mu\text{L}$  až  $1,7 \times 10^3$  kopií/ $\mu\text{L}$ . Naředěné vzorky pseudovirionů, společně se standardy a negativní kontrolou byly poté smíchány s reakční směsí (viz tabulka 2) a naneseny v triplikátech na bílou 384-jamkovou destičku (Roche). Celkový objem jedné reakce činil 10  $\mu\text{L}$ . Manipulace se vzorky probíhala vždy v laminárním boxu (Esco) a za použití špiček s filtrem. Destička byla po nanesení všech vzorků překryta transparentní folií.

	1x reakce ( $\mu\text{L}$ )
SYBR GREEN mix	5
Fluc_qPCR_up2 [ $c = 0,3 \mu\text{M}$ ]	0,6
Fluc_qPCR_rev2 [ $c = 0,3 \mu\text{M}$ ]	0,6
demiH <sub>2</sub> O	1,8
Templát	2

**Tabulka 2: Složení reakční směsi pro qPCR** - Ionty, dNTPs a DNA polymeráza byly do reakční směsi přidávány vždy jako předmíchaný komerční SYBR GREEN mix. Pro qPCR byl použit buď iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Bio-Rad), nebo Sso-Advanced Universal Sybr Green Supermix (Bio-Rad). Do směsi byly přidány primery: Fluc\_qPCR\_fw2: 5'-ATTACCAGGGATTTCAGTCGATGT-3' a Fluc\_qPCR\_rev2: 5'-ATCAGTGCAATTGTCTTGTCCTA-3'. Templát byl do směsi přidán vždy jako poslední. Jako templát sloužily pseudoviriony se zabaleným plazmidem po ošetření DNázou I.

Připravená destička s nanesenými vzorky byla těsně před kvantifikací centrifugována při 1 000x g, 1 minutu. Poté se destička vložila do přístroje LightCycler R80 Real-TimePCR (Roche), kde se zadal příslušný program (viz tabulka 3) a zahájilo měření. Získaná data byla vyhodnocena v softwaru LightCycler<sup>®</sup> 480 SW 1.5.1 (Roche).

	Doba trvání	Teplota	Rychlost změny teploty
<i>Pre-inkubace</i>	10 min	94 °C	(4,4 °C/s)
<i>Amplifikace</i> (40 cyklů)	20 s	94 °C	(4,8 °C/s)
	15 s	58 °C	(2,2 °C/s)
	20 s	72 °C	(4,4 °C/s)
<i>Křivka tání</i>	5 s	95 °C	(4,4 °C/s)
	60 s	65 °C	(2,2 °C/s)
		97 °C	(0,11 °C/s) - průběžně
<i>Chlazení</i>	45 s	40 °C	(2,5 °C/s)

**Tabulka 3: Program pro kvantifikaci pGL3-control metodou qPCR**

#### 4.2.7.4 Fenol-izoamylalkohol-chloroformová extrakce DNA z pseudovirionů

DNA byla extrahována z 10  $\mu\text{g}$  pseudovirionů. Pseudoviriony byly nejprve naředěny v 1x koncentrovaném inkubačním pufru. K částicím se poté přidala DNáza I (finální koncentrace činila 0,4 U/mL) a vzorky se inkubovaly 10 minut při 37 °C. Poté se přidala EDTA (o finální koncentraci 0,5 mM) pro inaktivaci DNázy I. Vzorek se inkuboval 10 minut při 75 °C. Pro extrakci DNA z částic byla použita proteináza K (o finální koncentraci 50

μg/mL). Vzorek se inkuboval 1 hodinu při 56 °C. Potom se přidal dithiothreitol (o finální koncentraci 25 mM), a s ním se vzorek inkuboval dalších 30 minut při 56 °C. Ke vzorku se přidala demiH<sub>2</sub>O do konečného objemu 400 μL. Přidalo se 400 μL fenolu (v poměru 1:1). Vzorek se promíchal na vortexu, a poté centrifugoval 3 minuty při 20 000x g. Vrchní vodná fáze s DNA se přendala do nové mikrozkušavky. Do mikrozkušavky se následně přidalo 400 μL fenol:izoamylalkohol:chloroform [25:1:24]. Roztoky se promíchaly pomocí vortexu, a opět centrifugovaly 3 minuty při 20 000x g. Vrchní vodná fáze se opatrně odebrala opět do nové mikrozkušavky. Následně se ke vzorku přidala 1/10 objemu 3 M acetátu sodného (pH = 5,2) a 2,5 objemu 96% ethanolu. DNA se pak nechala v tomto roztoku srážet přes noc při -20 °C. Vzorek se potom centrifugoval 30 minut při 20 000x g, 4 °C. Následně se odstranil supernatant bez porušení DNA peletu. Pelet se dodatečně promyl 70% ethanolem, poté centrifugoval 30 minut při 20 000x g, 4 °C. Ethanol se odstranil bez porušení peletu DNA a pelet se sušil za laboratorní teploty. Na závěr se pelet zbavený ethanolu rozpustil ve sterilní demiH<sub>2</sub>O a zamrazil při -20 °C. Vzorky byly posléze použity na DNA elektroforézu, transformaci bakterií a kvantifikaci DNA metodou qPCR.

## 4.2.8 Manipulace s proteiny

### 4.2.8.1 Detekce virových proteinů metodou dot blot

Za účelem detekce virových proteinů VP1, VP2, či VP3 se vybraný vzorek nejprve nanesl po 1 μL na dvě nitrocelulózové membrány (Amersham). Obě membrány se následně inkubovaly v 5% (w/V) roztoku sušeného mléka v PBS (dále jen 5% roztok mléka) 1 hodinu. Mezitím se připravila primární myší protilátka proti VP1 a primární myší protilátka proti sdílené sekvenci VP2 a VP3. Protilátka proti VP1 byla směs myších monoklonálních protilátek IgG 20x ředěné „D4“ spolu s 50x ředěnou „Anglií“ v 1 mL 5% roztoku mléka. Protilátka proti VP2/3 byla myší monoklonální IgG protilátka 2x ředěná „1A2“ v 700 μL roztoku mléka. Po inkubaci se membrány zatavily do fólie s příslušnou protilátkou, kde se inkubovaly 1 hodinu. Poté se membrána 3x promyla v 1x PBS po dobu 10 minut na třepačce. Následně se membrány zatavily do fólie s 1 000x ředěnou sekundární kozí protilátkou proti myší protilátce a s peroxidázou. Inkubace trvala 30 minut. Poté se membrána opět 3x promyla v 1x PBS, 10 minut na třepačce. Zároveň se připravily dva roztoky:

- Roztok A: 200 μL 250mM luminol v DMSO (Sigma-Aldrich) + 88 μL 90mM kyseliny p-kumarové v DMSO (Sigma-Aldrich) + 2 mL 1 M Tris-HCl (pH = 8,5) + 18 mL dH<sub>2</sub>O
- Roztok B: 20 μL 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 2 mL 1 M Tris-HCl (pH = 8,5) + 18 mL dH<sub>2</sub>O

Těsně před vyvoláním signálu na membránách se oba roztoky smíchaly a po přesně 30 sekundách se směs nanese na příslušnou membránu. Signál byl vyfotografován na přístroji pro měření chemiluminiscence Fusion FX (Vilber). Získaná data se poté vyhodnotila.

#### **4.2.8.2 Měření koncentrace proteinů pomocí Qubit**

Qubit<sup>TM</sup> Protein Assay kit (Invitrogen) byl použit ke zjištění množství virových proteinů ve vzorcích izolovaných částic. Pro každý vzorek se předem namíchalo 200  $\mu$ L roztoku Qubit<sup>TM</sup> pufru a Qubit<sup>TM</sup> činidla v poměru 200:1. Roztok se promíchal na vortexu a nanese do čirých mikrozkušavek spolu se vzorkem, či Qubit<sup>TM</sup> standardem (S1; S2; S3) v poměru 20:1 tak aby finální objem činil 200  $\mu$ L. Směs se krátce promíchala na vortexu a nechala při laboratorní teplotě inkubovat 15 minut. Po 15 minutách se, počínaje standardy, mikrozkušavky vkládaly do fluorometru Qubit (Invitrogen) a odečítaly koncentrace proteinů.

#### **4.2.8.3 Srážení proteinů methanolem**

Vzorky určené pro srážení methanolem se nejprve naředily tak, aby ve 200  $\mu$ L bylo právě 10  $\mu$ g proteinu. Následně se ke 200  $\mu$ L přidalo 600  $\mu$ L koncentrovaného methanolu. Vzorek se promíchal na vortexu. Ke vzorku se přidalo 150  $\mu$ L chloroformu a opět se vzorek promíchal na vortexu. Následně se přidalo ke vzorku 400  $\mu$ L demiH<sub>2</sub>O a opět se vše promíchalo na vortexu. Vzorky se centrifugovaly 5 minut při >13 000x g. Odebrala se vrchní vodná fáze tak, aby se neporušila mezivrstva. Poté se přidalo 600  $\mu$ L koncentrovaného methanolu, vzorek se promíchal na vortexu a centrifugoval opět 5 minut při >13 000x g. Odstranil se supernatant a proteinový pelet se nechal usušit. Nakonec se pelet rozpustil v 10  $\mu$ L 1x koncentrovaném Laemmli vzorkovacím pufru (Sigma-Aldrich). Vzorky se poté denaturovaly 5 minut při 95 °C v termobloku (Biosan). Po denaturaci se vzorky uskladnily při -20 °C. Později se tyto vzorky nanášely na gel během elektroforézy v komerčním polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE).

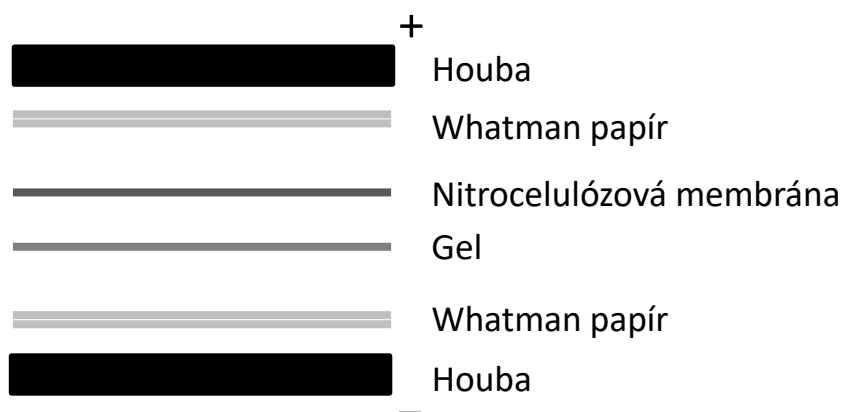
#### **4.2.8.4 SDS-PAGE a přenášení proteinů na nitrocelulóзовou membránu**

Komerční 12% gel Mini-PROTEAN® TGX<sup>TM</sup> (Bio-Rad) byl vložen do aparatury pro proteinovou elektroforézu (Bio-Rad). Gel se poté přelil až po okraj 1x „running“ pufrém. Vzorky denaturovaných proteinů v 1x vzorkovacím pufru byly nanášeny po 10  $\mu$ L na komerční gel. Současně bylo nanese 10  $\mu$ L markeru Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Proteinová elektroforéza probíhala při konstantních 100 V, 40-35 mA pomocí zdroje PowerPac Basic<sup>TM</sup> (Bio-Rad). Elektroforéza probíhala, dokud referenční barvivo na gelu nedorazilo za spodní referenční čáru (přibližně 90 minut).



Po dokončení SDS-PAGE se gel vyjmul ze skla a vložil do tzv. „blotovacího sendviče“ (viz obrázek 9). „Blotovací sendvič“ se po přípravě ponořil do aparatura pro přenášení proteinů na membránu (Bio-Rad) s ledově vychlazeným 1x „blotovacím“ pufrem s obsahem 20 % methanolu. Celá aparatura se položila do misky s ledem na magnetické míchadlo. Po čas přenášení proteinů bylo nutné aparaturu neustále chladit. Přenášení proteinů probíhalo při konstantních 250 mA 3 hodiny pomocí zdroje PowerPac Basic™ (Bio-Rad).



Obrázek 9: Schéma přípravy tzv. „blotovacího sendviče“

#### 4.2.8.5 Barvení membrány komerčním roztokem

Po přenesení proteinů na membránu se membrána vyňala z „blotovacího sendviče“ a ponořila se do fixačního roztoku 7% kyseliny octové s 10% methanolem na 15 minut. Poté se membrána promyla 4x 5 minut v dH<sub>2</sub>O. Membrána se ponořila do komerčního vyvolávacího roztoku SYPRO® Ruby Protein Stain (Invitrogen) na 15 minut. Membrána se následně promyla 5x 1 minutu v dH<sub>2</sub>O. Membrána byla poté nasnímána v přístroji s UV světlem Fusion FX (Vilber).

#### 4.2.8.6 Imunobarvení (western blot)

Po nasnímání membrány po barvení komerčním vyvolávacím roztokem se membrána ponořila přes noc do roztoku 5% mléka při 4 °C. Membrána se přenesla do roztoku 4x ředěné primární myši monoklonální protilátky proti VP2/3 „2C8“ v 5% mléce a inkubovala 1 hodinu. Poté se membrána promyla 3x 10 minut v 1x PBS. Membrána se vložila do 1 000x ředěné sekundární koží protilátky proti myši s peroxidázou. Inkubace trvala 30 minut. Poté se membrána opět promyla 3x 10 minut v 1x PBS. Zároveň se připravily dva roztoky:

- Roztok A: 200 µL 250mM luminol v DMSO (Sigma-Aldrich) + 88 µL 90mM kyseliny p-kumarové v DMSO (Sigma-Aldrich) + 2 mL 1 M Tris-HCl (pH = 8,5) + 18 mL dH<sub>2</sub>O
- Roztok B: 20 µL 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 2 mL 1 M Tris-HCl (pH = 8,5) + 18 mL dH<sub>2</sub>O

Těsně před vyvoláním signálu na membránách se oba roztoky smíchaly a po přesně 30 sekundách se nanely na příslušnou membránu. Signál byl vyfotografován na přístroji pro měření chemiluminiscence Fusion FX (Vilber).

Daná membrána byla poté inkubována v koncentrovaném peroxidu vodíku (Penta) po dobu 15 minut při 37 °C. Po inkubaci byla membrána promyta nejprve kohoutkovou vodou, poté dH<sub>2</sub>O a nakonec v 1x PBS. Membrána byla poté inkubována v roztoku 5% mléka přes noc. Následující den se membrána inkubovala v 50x ředěné monoklonální myší protilátce proti VP1, „Anglie“. Protilátka byla ředěná v roztoku 5% mléka. Inkubace trvala 1 hodinu. Pokračovalo se promytím 3x 10 minut v 1x PBS. Membrána byla inkubována s 1 000x ředěnou sekundární kozí protilátkou proti myší protilátce s peroxidázou v roztoku 5% mléka po dobu 30 minut. Membrána byla opět promyta 3x 10 minut 1x PBS. Signál byl vyvolán inkubací membrány se směsí roztoků A a B v poměru 1:1 po dobu 30 sekund. Signál byl nakonec vyfotografován na přístroji pro měření chemiluminiscence Fusion FX (Vilber).

#### **4.2.8.7 Barvení gelu po přenesení proteinů na membránu**

Gel se po přenesení proteinů na membránu promyl v demiH<sub>2</sub>O 1x 5 minut, a poté se ponořil přes noc do komerčního Imperial<sup>TM</sup> Protein Stain (Thermo Fisher Scientific) roztoku. Další den se roztok odebral a gel se nechal promýt v demiH<sub>2</sub>O alespoň 1 hodinu. Poté se gel nasímal na přístroji Fusion FX (Vilber). Toto barvení sloužilo k odhalení proteinů, které se z gelu nepřenesly na nitrocelulózovou membránu.

## 5. Výsledky

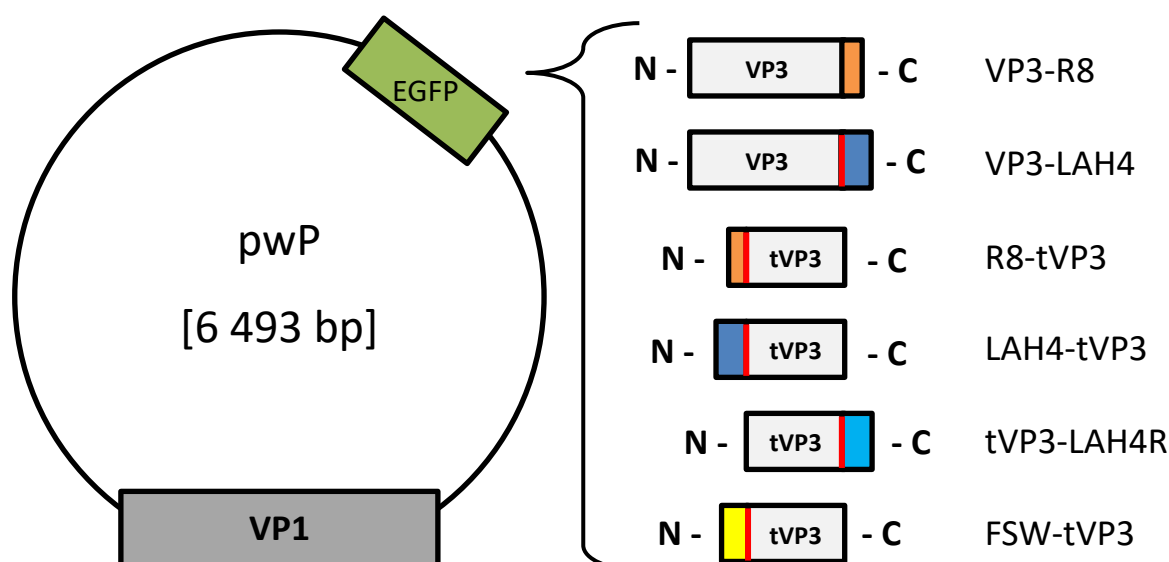
### 5.1 Příprava modifikovaných i nemodifikovaných virových částic

Hlavním důvodem přípravy virových částic odvozených od MPyV bylo navrhnout modifikaci, která by zvýšila transdukční schopnost částic odvozených od MPyV. V této práci je kladen důraz na modifikaci minoritního kapsidového proteinu VP3 peptidem penetrujícím membrány (CPP). Pro srovnání účinnosti transdukce modifikovaných částic s účinností transdukce nemodifikovanými částicemi byly připraveny kontrolní vzorky částic tvořené pouze proteinem VP1 a vzorky částic tvořené proteiny VP1, VP2 a VP3. Všechny používané modifikované i nemodifikované (kontrolní) virové částice odvozené od MPyV byly za pomoci metod genového inženýrství připraveny v laboratoři virologie.

Základem bylo připravit plazmidové konstrukty, které by zajistily tvorbu virové kapsidy. Všechny konstrukty proto obsahují gen pro VP1. Za účelem přípravy modifikovaných částic byl do konstruktů zaveden i gen pro VP3 obohacený o CPP. VP3 byl vybrán jako nosič příslušné modifikace, protože jde o kratší variantu VP2. Prodloužení VP3 dodatečným peptidem by tak nemělo stericky bránit ve tvorbě kapsidy. Připravené plazmidové konstrukty byly následně transfekovány do lidských buněk 293TT, což dalo vzniknout virovým částicím. Tyto částice byly následně z buněk izolovány.

#### 5.1.1 Příprava plazmidových konstruktů

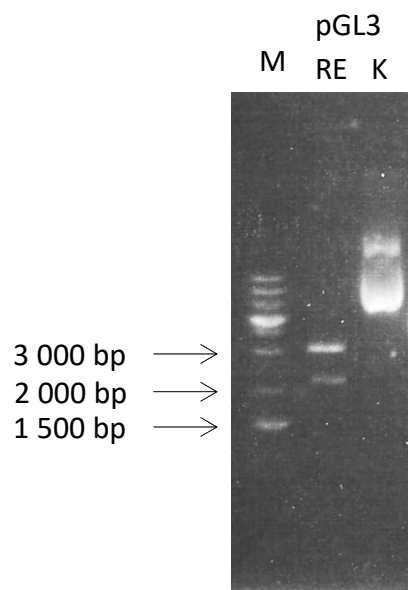
Všechny používané plazmidové konstrukty, tj. pEF1-LATE, pH2-VP1 a pwP-plazmidy, byly navrženy a připraveny nebo upraveny v laboratoři virologie. Plazmid pEF1-LATE posloužil k produkci částic obsahující proteiny VP1, VP2 a VP3. Plazmid pH2-VP1 byl použit pro tvorbu proteinů VP1 a VP2. Plazmid pwP posloužil k produkci VP1 s modifikovaným VP3. Do plazmidu pwP byl nejprve umístěn gen pro VP1. Potom namísto původního genu pro EGFP byla ve spolupráci s Mgr. Janou Váňovou za pomoci restrikčních enzymů MluI a NotI odstraněna EGFP sekvence a vložena sekvence kódující modifikovaný VP3 s CPP (viz obrázek 10). Přítomnost vložených genů byla po klonování ověřena pomocí sekvenace DNA.



**Obrázek 10: Schéma přípravy plazmidových konstruktů odvozených od pwP** - Nalevo je znázorněn plazmid pwP s již vloženým genem pro VP1, do kterého byly přidány geny s modifikovaným VP3 namísto genu EGFP. Napravo jsou schematicky vyobrazeny sekvence produktů vkládaných genů na pozici genu EGFP. tVP3 značí sekvenci VP3 zkrácenou o prvních 99 aminokyselin. Argininová (R8) sekvence je znázorněna oranžově, LAH4 sekvence je znázorněna tmavě modře. Invertovaná LAH4 sekvence (LAH4R) je znázorněna světle modře a žlutě je znázorněna FSW sekvence. Červeně je znázorněna sekvence spojující CPP a VP3. Varianta VP3-R8 tuto spojovací sekvenci jako jediná neobsahovala.

Takto vzniklo celkem 6 pwP-plazmidů (pwP\_VP3-R8, pwP\_R8-tVP3, pwP\_VP3-LAH4, pwP\_tVP3-LAH4R, pwP\_LAH4-tVP3, pwP\_FSW-tVP3) pro produkci modifikované kapsidy. V práci jsou tyto plazmidy označovány, jako plazmidy pomocné. Aminokyselinové sekvence pro VP3 s CPP jsou vypsány v kapitole 4.1.10. Dodatečně byl připraven plazmid, který umožnil expresi pouze hlavního strukturního proteinu VP1 (pwP-ΔGFP). Získané pomocné plazmidy byly posléze použity za účelem tvorby modifikovaných pseudovirionů odvozených od MPyV.

Reportérový plazmid pGL3-control, stejně jako pomocné plazmidy, byl namnožen v bakteriální kultuře *E. coli* TOP10, a následně izolován prostřednictvím komerčního kitu odstraňujícího endotoxiny (viz kapitola 4.2.2.1). Po izolaci se změřila koncentrace DNA a ověřila se identita plazmidu restrikčním štěpením (viz obrázek 11). Plazmid byl štěpen podle doporučení výrobce enzymy BamHI a HindIII. Velikost fragmentů štěpeného pGL3-control odpovídala očekávané velikosti fragmentů (3 059 bp; 2 197 bp).



**Obrázek 11: Fotografie gelu po DNA elektroforéze plazmidu pGL3-control štěpeného restrikčními enzymy** - Marker molekulových hmotností (M) Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) je vpravo s popiskem významných velikostí. Uprostřed je pGL3-control plazmid štěpený restrikčními enzymy (RE). Vlevo je kontrolní vzorek neštěpeného pGL3-control plazmidu (K).

### 5.1.2 Izolace virových částic

Pseudoviriony (PsV) se připravovaly ve dvou variantách: (i) PsV s VP1 a modifikovaným VP3, a (ii) PsV s VP1, modifikovaným VP3 a nemodifikovaným VP2. VP2 byl přidán za účelem vytvoření částic, které by se od kontrolních nemodifikovaných částic lišily pouze v modifikovaném VP3. Pro přípravu pseudovirionů se ko-transfekovaly buňky 293TT pomocným a reportérovým plazmidem v poměru 1:1 (viz kapitola 4.2.3.2). Pseudoviriony, které obsahovaly VP1, modifikovaný VP3 a VP2 protein, se ko-transfekovaly celkem třemi plazmidy v poměru 1:1:1 (dva pomocné plazmidy a jeden reportérový plazmid). Jako reportérový plazmid se použil pGL3-control, který obsahuje gen pro luciferázu. Informace, jakými plazmidy byly buňky transfekovány za účelem přípravy daných pseudovirionů, je znázorněna v tabulce č. 4.

Pseudoviriony	Pomocný plazmid 1	Pomocný plazmid 2
PsV_VP123	pEF1-LATE	
PsV_VP1	pwP_ΔGFP	
PsV_VP1+VP3-R8	pwP_VP3-R8	
PsV_VP1+R8-tVP3	pwP_R8-tVP3	
PsV_VP1+VP3-LAH4	pwP_VP3-LAH4	
PsV_VP1/2+VP3-R8	pwP_VP3-R8	pH2-VP1
PsV_VP1/2+R8-tVP3	pwP_R8-tVP3	pH2-VP1
PsV_VP1/2+VP3-LAH4	pwP_VP3-LAH4	pH2-VP1
PsV_VP1+tVP3-LAH4R	pwP_tVP3-LAH4R	
PsV_VP1+LAH4-tVP3	pwP_LAH4-tVP3	
PsV_VP1+FSW-tVP3	pwP_FSW-tVP3	

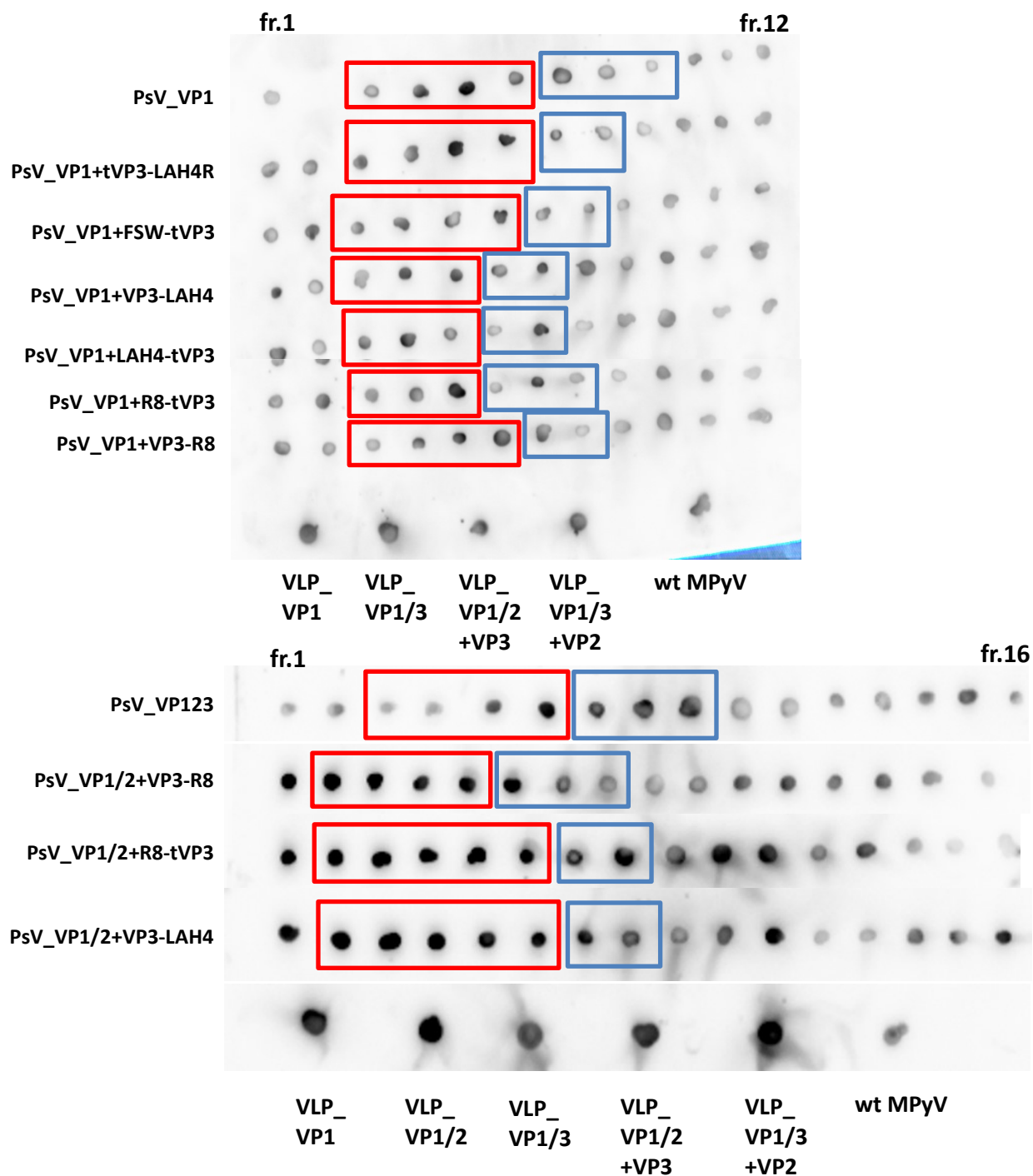
**Tabulka 4: Plazmidy použité pro přípravu konkrétních pseudovirionů** - Ko-transfekce buněk 293TT zahrnovala ve všech případech reportérový plazmid pGL3-control. pEF1-LATE obsahuje všechny tři strukturní nemodifikované proteiny myšího polyomaviru. pwP\_ΔGFP je plazmid obsahující gen pro VP1 a sekvenci pro EGFP. Avšak sekvence pro EGFP nese mutaci, která brání jeho exprese. Všechny ostatní plazmidy s označením pwP obsahují gen pro VP1 a gen pro VP3 s připojeným CPP. pH2-VP1 plazmid obsahuje sekvence pro VP1 i VP2.

Buňky byly po transfekci inkubovány v termostatu při 37 °C v atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub>. Po 48 hodinách byly buňky produkující virové částice sklizeny a v podobě peletu prozatímne zamrazeny při –20 °C. Virové částice byly následně izolovány ultracentrifugací v CsCl gradientu (viz kapitola 4.2.4.1). Vzniklý gradient byl rozdělen na celkem 12, nebo 16 frakcí o objemu přibližně 0,5 mL. Všechny frakce byly charakterizovány stanovením refraktometrického indexu (viz tabulka 5).

Frakce	PsV_VP123	PsV_VP1	PsV_VP1 +VP3-R8	PsV_VP1 +R8-tVP3	PsV_VP1 +VP3-LAH4	PsV_VP1/2 +VP3-R8	PsV_VP1/2 +VP3-LAH4	PsV_VP1/2 +R8-tVP3	PsV_VP1/2 +VP3-LAH4	PsV_VP1 +tVP3-LAH4R	PsV_VP1 +LAH4-tVP3	PsV_VP1 +FSW-tVP3
1.	1,3750	1,3740	1,3750	1,3740	1,3730	1,3740	1,3740	1,3740	1,3735	1,3700	1,3730	1,3730
2.	1,3760		1,3765	1,3760	1,3760	1,3740	1,3740	1,3750	1,3750	1,3760	1,3760	1,3760
3.	1,3735	1,3720	1,3740	1,3740	1,3735	1,3720	1,3720	1,3740	1,3735	1,3745	1,3735	1,3740
4.	1,3710	1,3695	1,3710	1,3710	1,3700	1,3690	1,3720	1,3720	1,3710	1,3715	1,3700	1,3710
5.	1,3680	1,3665	1,3670	1,3680	1,3665	1,3660	1,3680	1,3680	1,3675	1,3680	1,3670	1,3675
6.	1,3645	1,3630	1,3625	1,3635	1,3625	1,3625	1,3650	1,3650	1,3640	1,3645	1,3620	1,3645
7.	1,3600	1,3600	1,3580	1,3590	1,3580	1,3580	1,3620	1,3620	1,3590	1,3600	1,3580	1,3595
8.	1,3560	1,3555	1,3530	1,3540	1,3530	1,3540	1,3570	1,3570	1,3540	1,3560	1,3530	1,3560
9.	1,3510	1,3500	1,3470	1,3490	1,3480	1,3480	1,3520	1,3520	1,3485	1,3520	1,3480	1,3510
10.	1,3450	1,3450	1,3420	1,3440	1,3435	1,3430	1,3490	1,3490	1,3440	1,3475	1,3430	1,3460
11.	1,3405	1,3415	1,3380	1,3390	1,3360	1,3390	1,3430	1,3430	1,3390	1,3425	1,3390	1,3390
12.	1,3380	1,3400	1,3360	1,3365	1,3400	1,3365	1,3390	1,3390	1,3370	1,3390	1,3370	1,3415
13.	1,3360					1,3355	1,3365	1,3365	1,3350			
14.	1,3355					1,3355	1,3360	1,3360	1,3350			
15.	1,3355					1,3355	1,3355	1,3350	1,3350			
16.	1,3355					1,3355	1,3355	1,3350	1,3350			

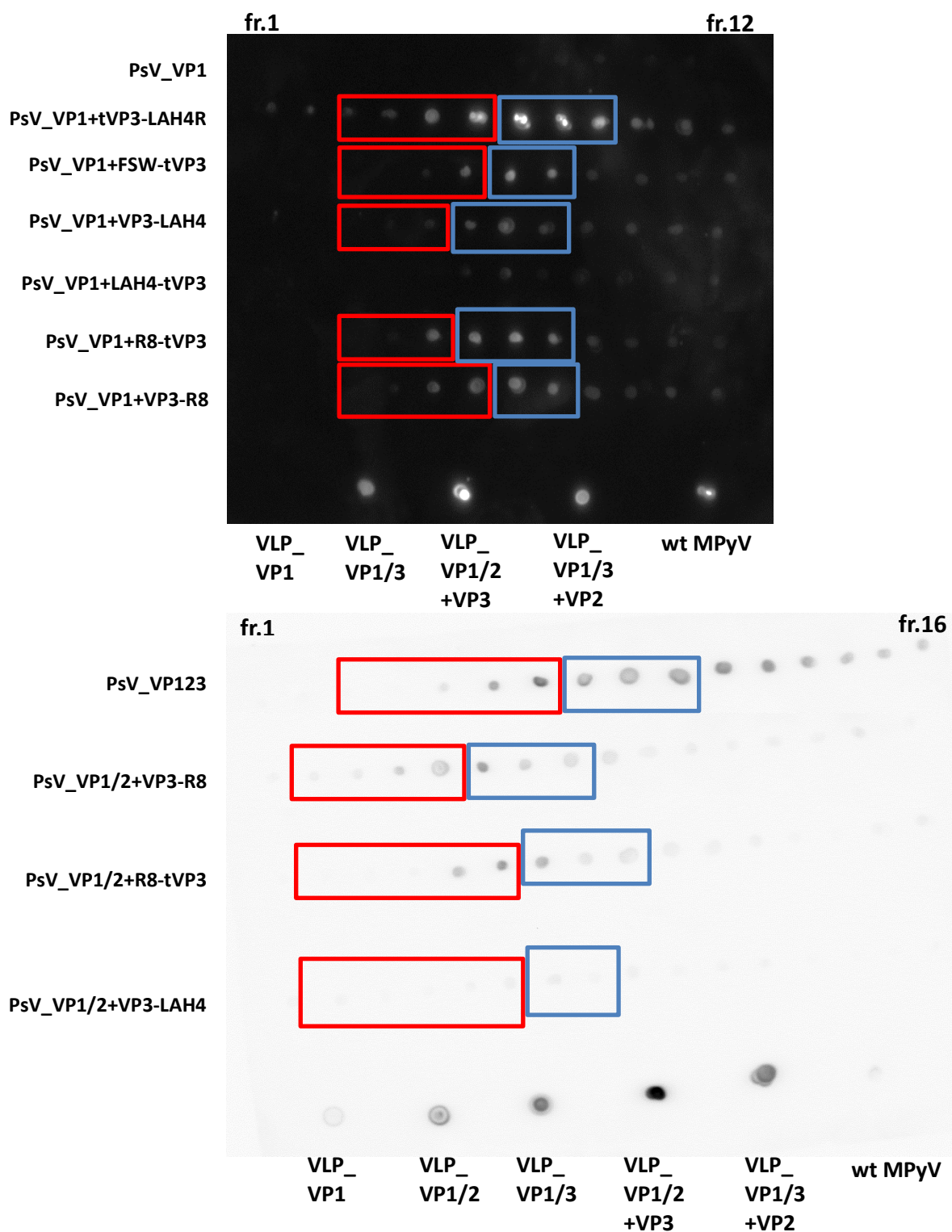
**Tabulka 5: Tabulka ukazující refraktometrické indexy jednotlivých frakcí po rozebrání CsCl gradientu izolovaných pseudovirionů ultracentrifugací – Červeně označené frakce byly sjednoceny do frakční skupiny A ( $\eta = 1,363 - 1,375$ ) a modře značené frakce byly sjednoceny do frakční skupiny B ( $\eta = 1,3500 - 1,3625$ ). Druhá frakce vzorku PsV\_VP1 byla z experimentu vyřazena, neboť během manipulace se frakce znehodnotila. Proto není uveden její refraktometrický index v tabulce.**

Před sjednocením frakcí se provedla metoda dot blot pro zjištění přítomnosti proteinů VP1 a VP2/3 (viz obrázky 12 a 13).



**Obrázek 12: Detekce virových proteinů protilátkou proti VP1 metodou dot blot** - Přítomnost proteinu VP1 se tímto pokusem potvrdila pro všechny frakce. Frakce byly na membránu nanášeny zleva doprava od 1. frakce po 12. frakci, nebo 16. frakci. Jako kontrolní vzorky byly použity VLP, které byly tvořeny jen z VP1 (VLP\_VP1), nebo kombinací VP1 s jedním typem minoritního strukturního proteinu (VLP\_VP1/2; VLP\_VP1/3), nebo kombinací všech tří proteinů (VLP\_VP1/2+VP3; VLP\_VP1/3+VP2). Dodatečně jako kontrolní vzorek sloužil infekční polyomavirus (wt MPyV). Všechny kontrolní vzorky byly poskytnuty ze zásob laboratoře. Barevné rámečky pak označují, které frakce byly později sjednoceny do frakčních skupin. Frakční skupina A (červeně) a frakční skupina B (modře).





**Obrázek 13: Detekce virových proteinů protilátkou proti VP2/3 metodou dot blot** - Přítomnost proteinu VP2 nebo VP3 se tímto pokusem potvrdila jen pro některé frakce. V případě první fotografie byl obraz invertován pro snazší detekci signálu. Frakce byly na membránu nanášeny zleva doprava od 1. frakce po 12. frakci, nebo 16. frakci. Kontrolní vzorky byly použity VLP, které byly tvořeny jen z VP1 (VLP\_VP1), nebo kombinací VP1 s jedním typem minoritního proteinu (VLP\_VP1/2; VLP\_VP1/3), nebo kombinací všech tří proteinů (VLP\_VP1/2+VP3; VLP\_VP1/3+VP2). Dodatečně jako kontrolní sloužil vzorek infekčního polyomaviru (wt MPyV). Všechny kontrolní vzorky byly poskytnuty ze zásob laboratoře. Barevné rámečky pak označují, které frakce byly později sjednoceny do frakčních skupin. Frakční skupina A (červeně) a frakční skupina B (modře). Vzorky, kde nebyl detekován dostatečný signál, nemají znázorněné frakční skupiny.

Na základě těchto dat byly vybrány a sjednoceny příslušné frakce. Pro každý vzorek izolovaných částic byly vytvořeny právě 2 frakční skupiny, A a B. Důležitým faktorem při výběru frakcí k sjednocení sloužila informace, že myší polyomavirové částice se zabalenou DNA lze očekávat ve frakcích s refraktometrickým indexem v rozmezí  $\eta = 1,365 - 1,366$ . Prázdné částice lze očekávat v rozmezí  $\eta = 1,362 - 1,363$  (Horníková *et al.*, 2015). Dalším podstatným faktorem je přítomnost virových proteinů, která byla zjištěna pomocí metody dot blot (viz obrázky 12 a 13). Na základě výsledků získaných po inkubaci membrány s protilátkou proti VP2/3 (viz obrázek 13) byly sjednoceny frakce, které mají menší anebo žádný signál. Předpokladem bylo, že čím silnější je signál, tím více je rozpadlého materiálu v dané frakci. Minoritní proteiny VP2 a VP3 jsou totiž lokalizovány uvnitř kapsidy. Pokud je kapsida neporušená, měly by VP2 a VP3 být před interakcí s protilátkou chráněny virovou kapsidou. Záměrem tedy bylo sjednotit frakce obsahující právě plné částice s minimálním množstvím rozpadlého materiálu. Frakční skupina A tak nejlépe splňuje tyto zadané podmínky. Uchována byla pro pozdější analýzu i frakční skupina B. Ve všech případech se do frakční skupiny A nezahrnula 1. frakce, protože byla vždy znehodnocena při odebrání.

Frakční skupiny byly následně dialyzovány v pufru B, aby se z nich odstranila sůl CsCl (viz kapitola 4.2.4.2). Částice izolované v těchto frakčních skupinách byly dále podrobeny charakterizaci.

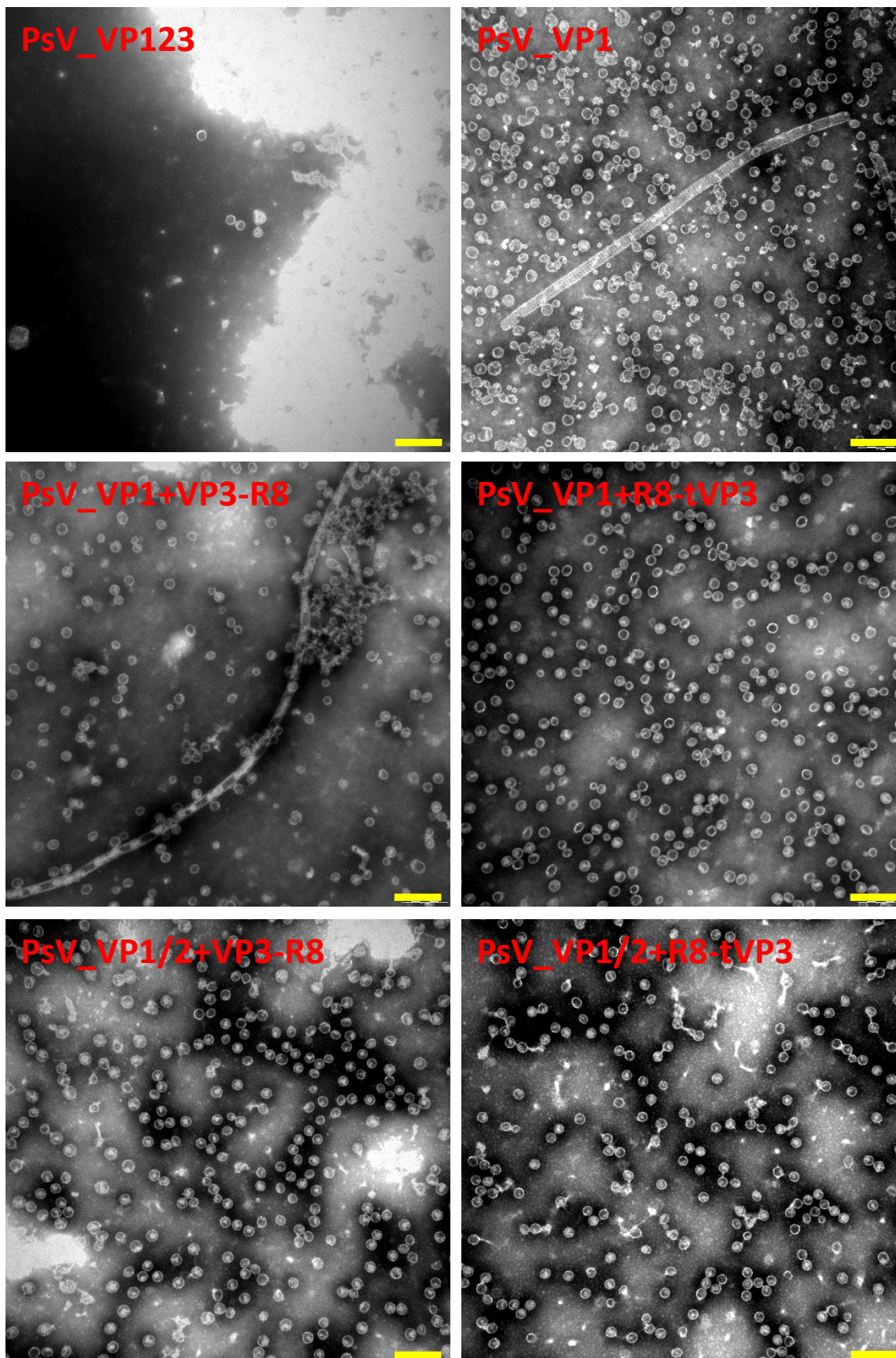
## 5.2 Charakterizace částic

K ověření, že izolace částic proběhla úspěšně, bylo třeba všechny izoláty podrobit charakterizaci. Prvním významným krokem k ověření přítomnosti částic v získaných izolátech byla přímá detekce částic pomocí elektronového mikroskopu. Pomocí softwaru ImageJ byla ze snímků získaných z TEM změřena velikost částic. Poté se změřila koncentrace proteinů. Kvalita získaných proteinů byla ověřena metodami SDS-PAGE spojené s přenesením proteinů na nitrocelulózovou membránu a následným vyvoláním pomocí komerčního činidla a imunobarvením. Posléze se přistoupilo k detekování reportérového plazmidu a k ověření, že se skutečně zabalil do virových částic. Současně se provedla absolutní kvantifikace zabalené plazmidové DNA metodou qPCR.

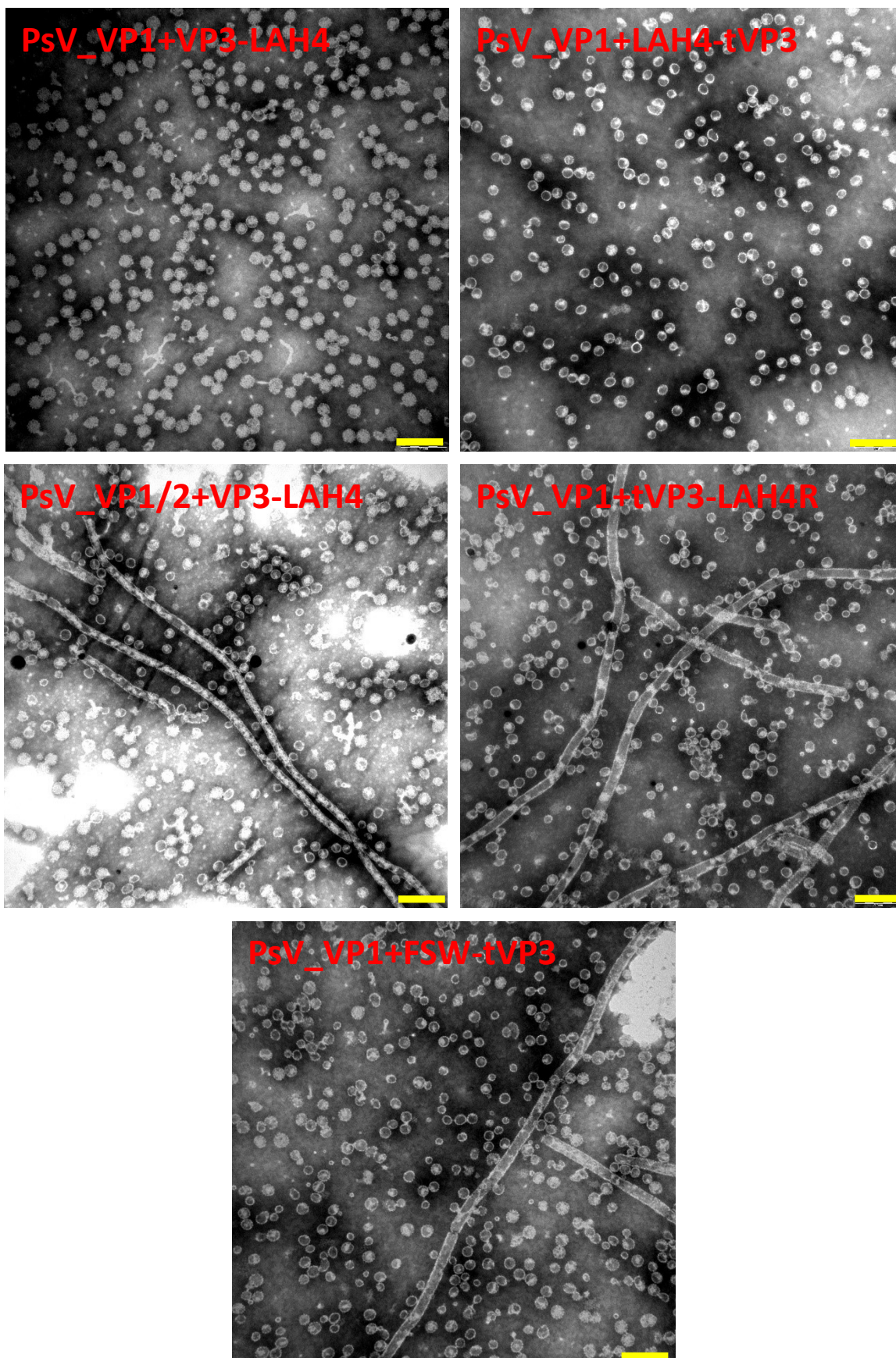
### 5.2.1 Přímá detekce částic prostřednictvím TEM

K úspěšné detekci vzniklých pseudovirionů pomocí TEM bylo zapotřebí vzorky nanést na měděnou síťku s uhlíkovou vrstvou a obarvit metodou negativního barvení (viz

kapitola 4.2.5). Pořízeny byly snímky všech vzorků z frakční skupiny A (viz obrázky 13 a 14) i frakční skupiny B (data nejsou uvedena). Následně se snímky vyhodnotily a porovnaly.



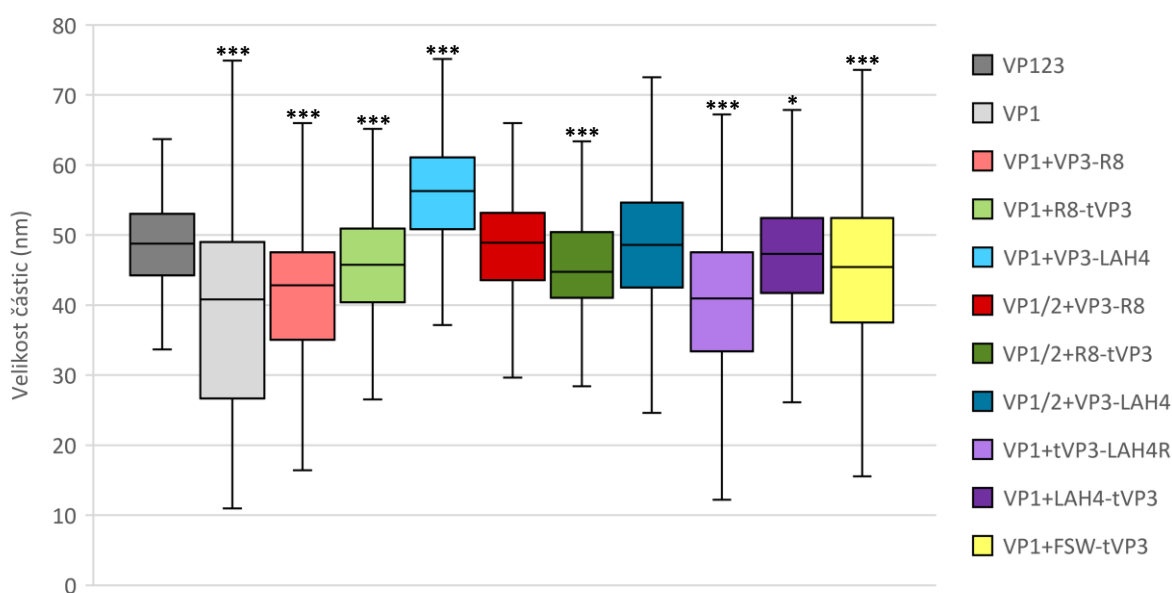




**Obrázek 14: Snímky izolátů pořízeny na TEM metodou negativního barvení** - Na obrázku je možné pozorovat prázdné (s tmavým vnitřkem) i plné částice (se světlým vnitřkem). Vzorky PsV\_VP1, PsV\_VP1+VP3-R8, PsV\_VP1/2+VP3-LAH4, PsV\_VP1+tVP3-LAH4R a PsV\_VP1+FSW-tVP3 kromě částic obsahují také tubulární struktury tvořené VP1 pentamery. Název vzorků je zvýrazněn červeným textem. Žlutá úsečka v pravém spodním rohu představuje 200 nm.

Ze snímků je patrné, že částice byly přítomny ve všech vzorcích. Rozdíly byly především v kvalitě vzorku, ve velikosti částic a v přítomnosti tubulárních struktur. Tyto tubulární struktury byly pozorovány ve vzorcích PsV\_VP1, PsV\_VP1+VP3-R8, PsV\_VP1/2+VP3-LAH4, PsV\_VP1+tVP3-LAH4R a PsV\_VP1+FSW-tVP3. Ze snímků se zdá, že tyto tubulární struktury jsou tvořeny pentamery hlavního strukturního proteinu VP1 (Mattern *et al.*, 1967).

Velikost částic byla blíže analyzována prostřednictvím softwaru ImageJ (analyzováno alespoň 300 částic pro každý vzorek) (viz graf 1).



**Graf 1: Krabicový diagram velikostí izolovaných pseudovirionů** - Medián je vyznačen černou úsečkou uvnitř krabice. Krabice znázorňuje horní kvantil (75 %) a spodní kvantil (25 %). Minimum a maximum je znázorněno jako hranice úsečky. Data byla analyzována Kruskal-Wallisovým testem ( $n \geq 300$ ; kde „n“ je počet analyzovaných částic). Pro porovnání mediánů velikosti částic kontrolního vzorku VP123 s ostatními vzorky byl použit Kruskal-Wallisův test s Benjamini-Hochbergovou korekcí p-hodnot. Hvězdičky v grafu vyjadřují statistickou významnost (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Nejnižší variabilitu (tj. rozdíl maxima a minima) ve velikosti částic měly kontrolní pseudoviriony se všemi strukturními proteiny (PsV\_VP123). Rozdíl maxima a minima u tohoto vzorku činil 38 nm. Naopak nejvyšší variabilitu ve velikosti částic vykazovaly pseudoviriony tvořené pouze VP1 (PsV\_VP1). Rozdíl maxima a minima u těchto pseudovirionů činil 83 nm.

Medián velikosti modifikovaných částic v porovnání s mediánem velikosti nemodifikovaných kontrolních částic PsV\_VP123 byl u většiny modifikovaných částic (PsV\_VP1, PsV\_VP1+VP3-R8, PsV\_VP1+R8-tVP3, PsV\_VP1/2+R8-tVP3, PsV\_VP1+tVP3-LAH4R, PsV\_VP1+FSW-tVP3) signifikantně nižší než medián velikosti kontrolních PsV\_VP123 ( $p < 0,001$ ). Signifikantně nižší se ukázal i medián velikosti částic

PsV\_VP1+LAH4-tVP3 vůči mediánu velikosti kontrolního vzorku PsV\_VP123 ( $p < 0,05$ ). Pouze medián velikosti částic s LAH4 peptidem na C-konci plnohodnotného VP3 (PsV\_VP1+VP3-LAH4) byl signifikantně vyšší než medián velikosti kontrolních PsV\_VP123 ( $p < 0,001$ ). Je zajímavé, že většina těchto částic při vizualizaci na TEM pomocí negativního barvení (viz obrázek 14) vykazovala znaky „plných“ částic (kontrastní látka se nedostala do vnitřku částic). Od kontrolních částic se velikostí signifikantně nelišily částice obsahující VP2, které mají modifikaci na C-konci nezkráceného VP3 (PsV\_VP1/2+VP3-R8 a PsV\_VP1/2+VP3-LAH4).

### 5.2.2 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena u všech vzorků pouze pro frakční skupinu A; tyto vzorky byly používány v následných experimentech. Naměřené hodnoty jsou zapsány v tabulce č. 6. Na základě získané koncentrace byl vypočten proteinový výtěžek.

<u>Vzorek</u> (frakční skupina A)	<u>Proteinová</u> <u>koncentrace</u> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<u>Objem</u> (mL)	<u>Výtěžek</u> ( $\mu\text{g}$ )
PsV_VP123	41,1	2,00	82,2
PsV_VP1	80,0	3,00	240,0
PsV_VP1+VP3-R8	110,0	2,00	55,0
PsV_VP1+R8-tVP3	83,6	1,75	47,8
PsV_VP1+VP3-LAH4	90,0	2,50	225,0
PsV_VP1/2+VP3-R8	72,6	2,25	163,4
PsV_VP1/2+R8-tVP3	69,7	3,00	209,1
PsV_VP1/2+VP3-LAH4	65,2	3,00	195,6
PsV_VP1+tVP3-LAH4R	48,6	2,75	133,7
PsV_VP1+LAH4-tVP3	86,0	2,00	172,0
PsV_VP1+FSW-tVP3	70,0	2,75	192,5

**Tabulka 6: Tabulka popisující proteinové koncentrace, objemy a výtěžky jednotlivých částic po izolaci** - Koncentrace proteinů byla změřena na fluorometru Qubit (Invitrogen). Objemy izolátů byly změřeny pomocí automatické pipety. Proteinový výtěžek byl vypočítán z objemu a hmotnostní koncentrace přes vzorec:  $m = \rho \times V$ .

Největší výtěžek vykazoval izolát částic, které byly tvořené pouze VP1. Naopak nejmenší výtěžek měly částice PsV\_VP1+R8-tVP3.

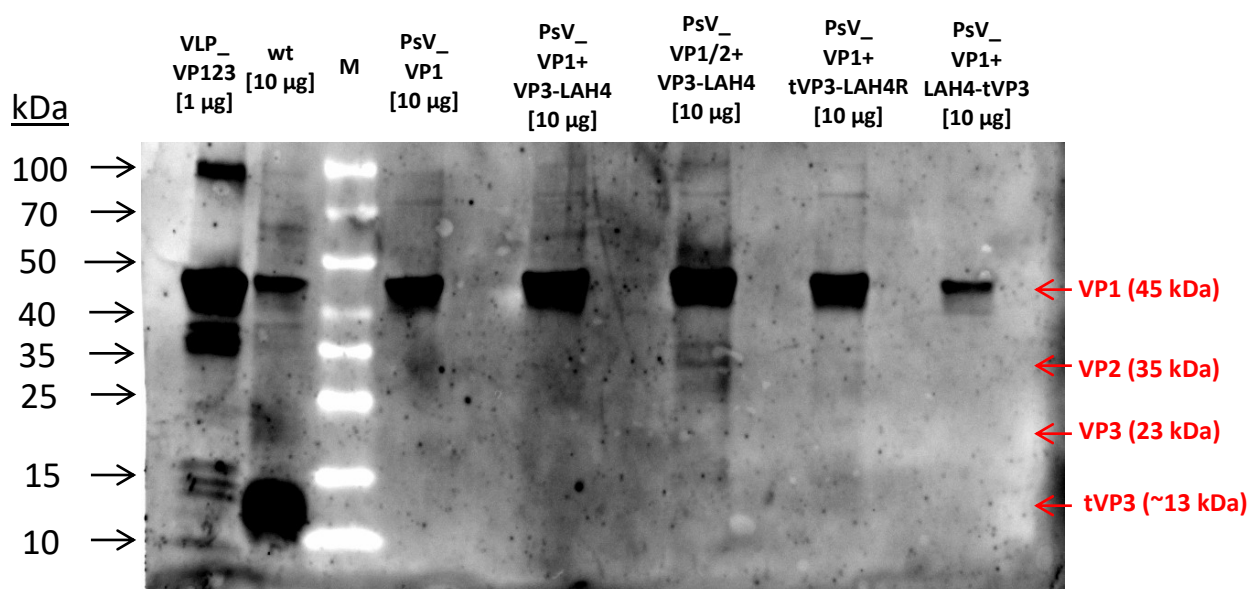
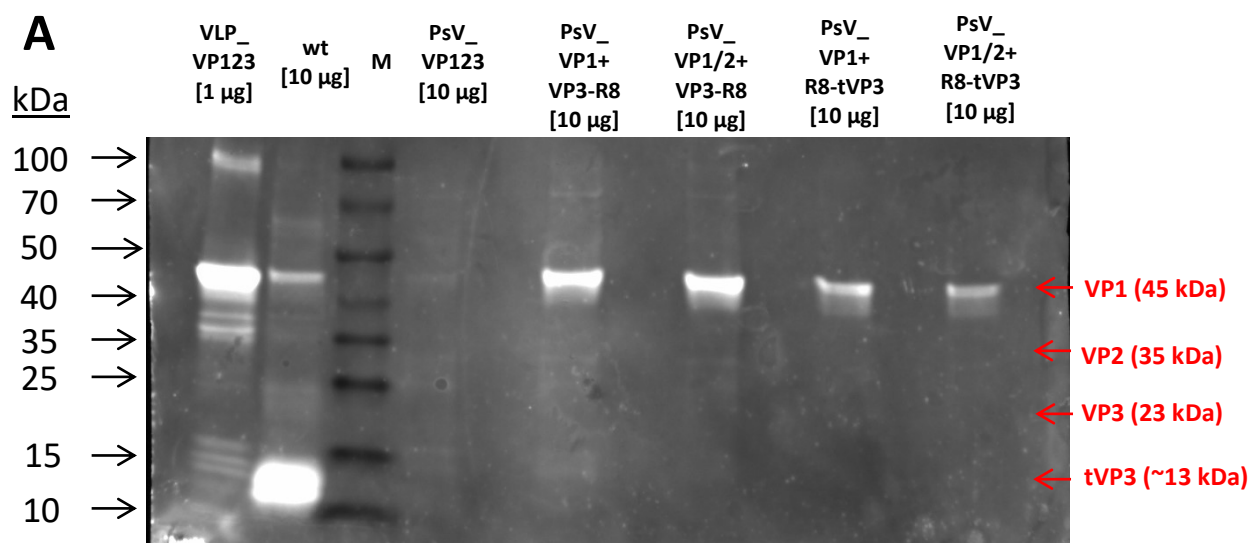
### 5.2.3 Ověření přítomnosti modifikovaného VP3 proteinu v pseudovirionech

Metodou dot blot se odhalila přítomnost virových proteinů v příslušných vzorcích. K jejich kvalitativní analýze se později provedla proteinová elektroforéza (viz kapitola 4.2.8.4). Vzhledem k tomu, že koncentrace proteinů byla ve vzorcích některých variant PsV nízká, byly před nanášením na gel sráženy methanolem (viz kapitola 4.2.8.3). Na gel bylo

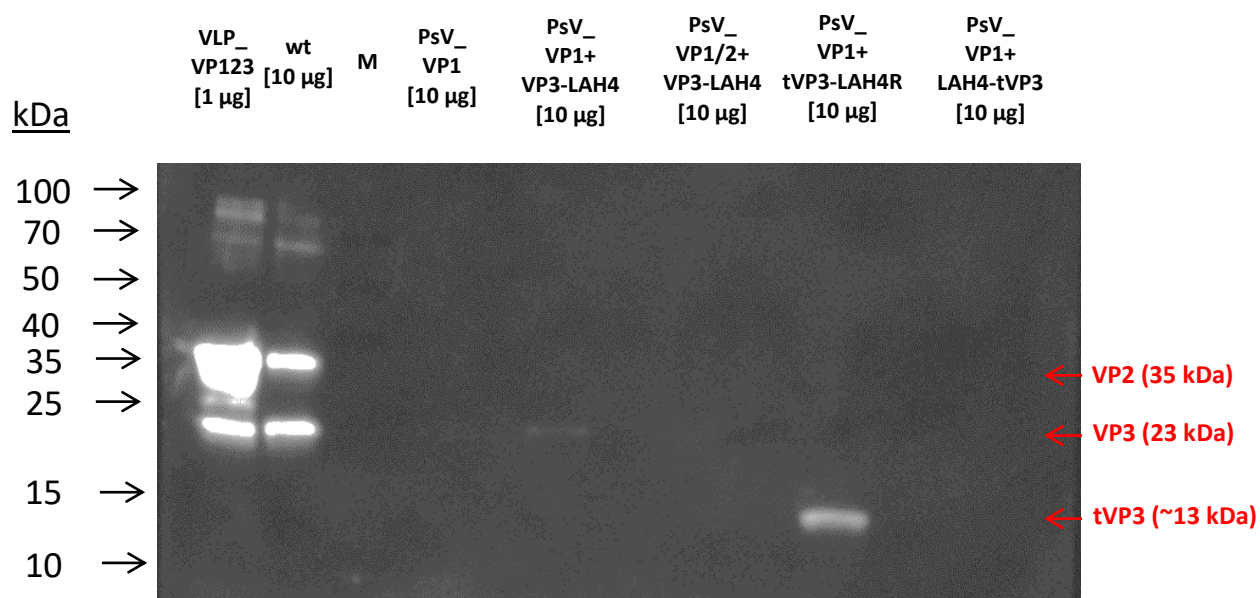
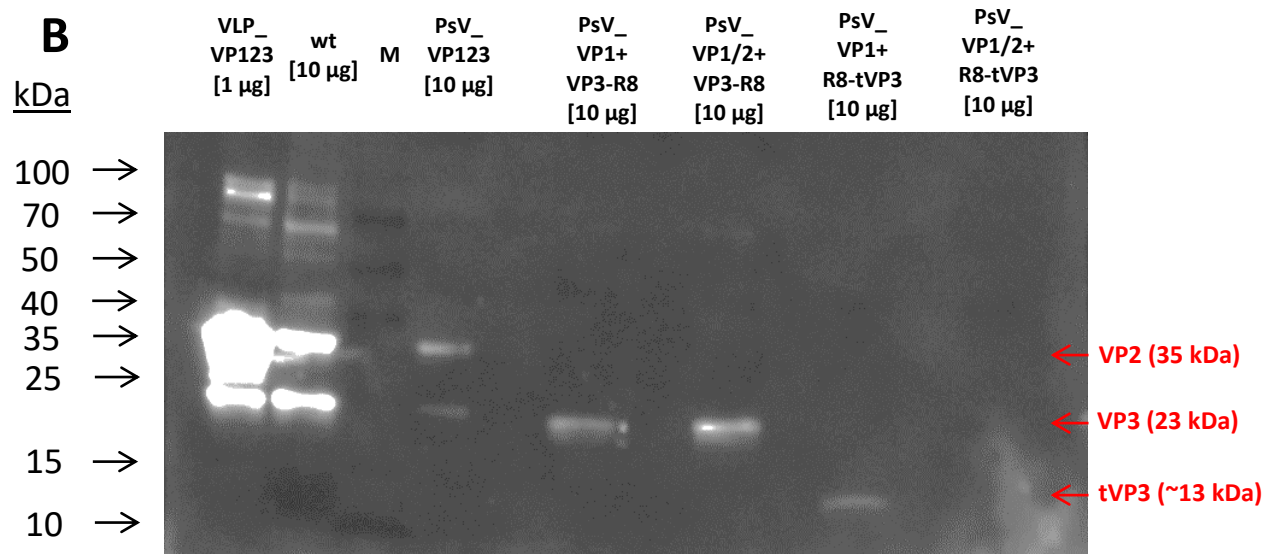
nanášeno podle předpokladu u všech vzorků 10 µg proteinů. Po SDS-PAGE se proteiny z gelu přenesly na nitrocelulózovou membránu (viz kapitola 4.2.8.4), a následně se provedlo barvení komerčním vyvolávacím roztokem SYPRO® Ruby Protein Stain (Invitrogen) (viz obrázek 15A). Tyto snímky potvrdily pro všechny užívané vzorky, že obsahují protein VP1, včetně částic PsV\_VP123, které vykazovaly pro VP1 velmi slabý signál. Minoritní proteiny pak byly touto metodou detekovány jen u některých vzorků. Jasný signál pro VP2 byl detekován jen pro kontrolní vzorek VLP\_VP123 a pro částice PsV\_VP1/2+VP3-LAH4. Slabší signál pro VP2 byl pak detekován u vzorku s divokým kmenem MPyV (wt). Minoritní protein VP3 byl touto metodou detekován pouze slabě, a to u kontrolního vzorku VLP\_VP123. Dodatečně lze poznamenat, že na membráně byly detekovány agregáty VP1 proteinu o velikosti přibližně 100 kDa u vzorku VLP\_VP123. Zároveň byly detekovány pravděpodobně buněčné histony v rozmezí 10 kDa až 20 kDa u kontrolních vzorků VLP\_VP123 a wt.

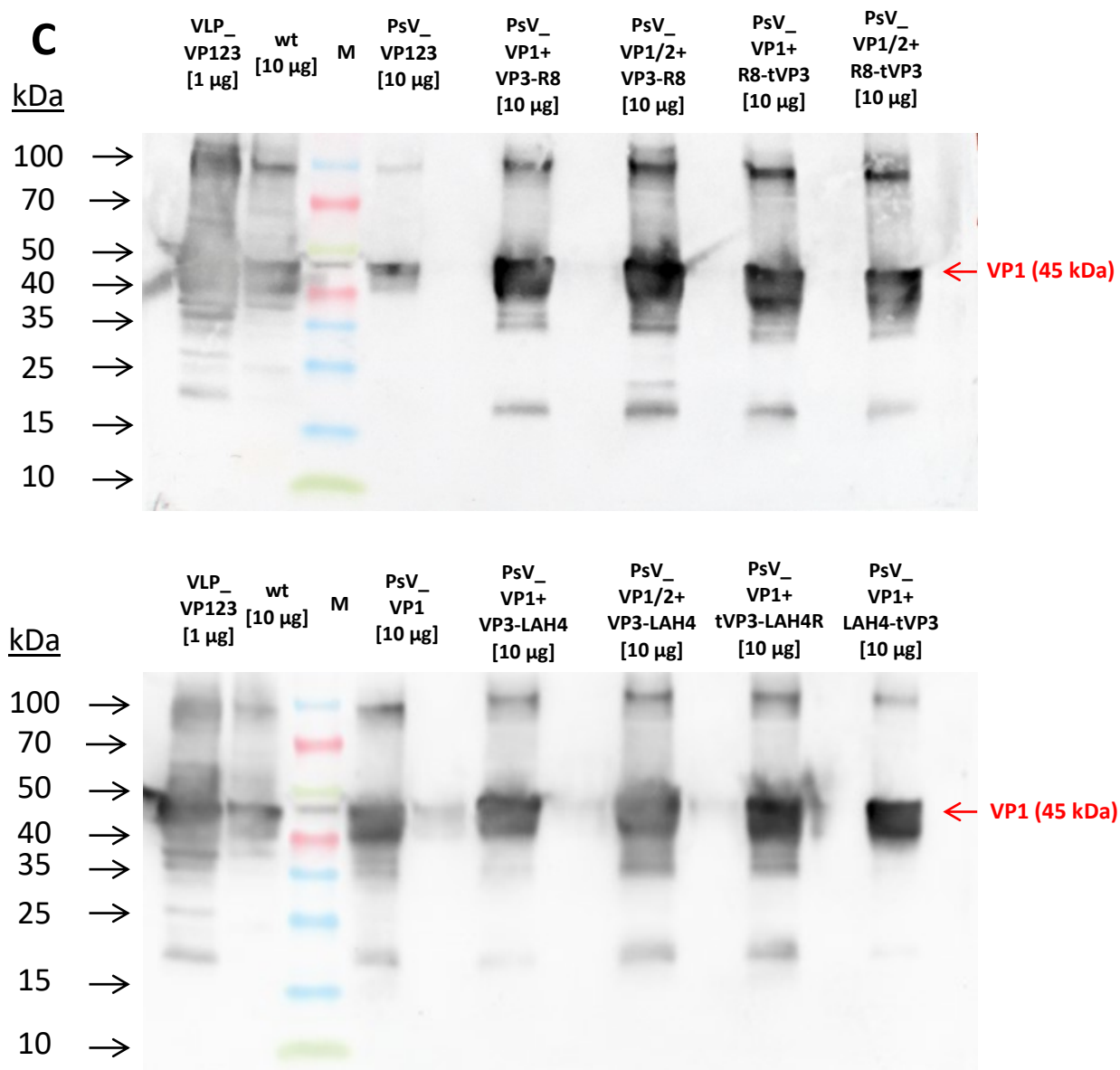
Po vyvolání proteinů pomocí komerčního vyvolávacího roztoku SYPRO® Ruby Protein Stain (Invitrogen) byly membrány imunobarveny nejprve protilátkou proti společné oblasti VP2 a VP3 (viz obrázek 15B), a poté dodatečně imunobarveny protilátkou proti VP1 (viz obrázek 15C). Z kapacitních důvodů se vzorek PsV\_VP1+FSW-tVP3 se nepodařilo úspěšně zahrnout do tohoto experimentu.

Ze snímků po imunobarvení bylo potvrzeno, že všechny použité vzorky obsahovaly VP1. Minoritní proteiny VP2 i VP3 byly úspěšně detekovány u všech kontrolních vzorků (VLP\_VP123; wt; PsV\_VP123). Bohužel se nepovedlo touto metodou u modifikovaných částic detekovat VP2. Na druhou stranu byl úspěšně detekován VP3, nebo tVP3 fúzovaný s CPP u téměř všech vzorků, kromě PsV\_VP1/2+R8-tVP3, PsV\_VP1/2+VP3-LAH4, PsV\_VP1+LAH4-tVP3. Vzorek PsV\_VP1+FSW-tVP3 nebyl v této analýze zahrnut.









**Obrázek 15:** Snímky membrány po vyvolání proteinů komerčním roztokem SYPRO® Ruby Protein Stain (A); po imunobarvení s protilátkou proti VP2/3 (B); po imunobarvení s protilátkou proti VP1 (C) - Po levé straně je vyobrazeno měřítko popisující molekulární hmotnost proteinů v kiloDaltonech (kDa) podle markeru (M, Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder). Červené šipky vpravo znázorňují předpokládané pozice, na kterých by se měl nacházet příslušný virový protein. Popis jednotlivých nanášených vzorků, včetně množství, je uveden nad snímkem. Jako kontroly byly připraveny VLP\_VP123, což jsou virové částice obsahující tři kapsidové proteiny produkované bakulovirovým expresním systémem, a virus MPyV (wt). Další nanášené vzorky byly pseudoviriony obsahující reportérový gen, které byly tvořeny všemi třemi strukturními proteiny (PsV\_VP123), nebo byly tvořeny pouze VP1 proteinem (PsV\_VP1). Ostatní nanášené vzorky byly vzorky pseudovirionů obsahující modifikovaný VP3. Snímky jsou softwarově (software Fusion FX) upraveny pro nejlepší možné zobrazení všech detekovatelných proteinů.

#### 5.2.4 Stanovení množství enkapsidované pDNA v pseudovirionech

Po izolaci pseudovirionů bylo současně stanoveno množství enkapsidovaného reportérového plazmidu pGL3-control (pDNA). Všechny vzorky byly ředěny na stejnou proteinovou koncentraci ( $c_{\text{prot}} = 41,1 \mu\text{g/mL}$ ). Tato konkrétní proteinová koncentrace byla

vybrána, protože se jednalo o nejnížší získanou proteinovou koncentraci vzorku po izolaci částic (PsV\_VP123). Množství enkapsidované pDNA bylo primárně stanovováno pomocí metody qPCR analýzou celých částic, tedy bez předchozí izolace enkapsidované pDNA (viz kapitola 5.2.4.1). Pro srovnání byla kvantifikace pDNA provedena i u vybraných vzorků po extrakci enkapsidované pDNA (viz kapitola 5.2.4.2).

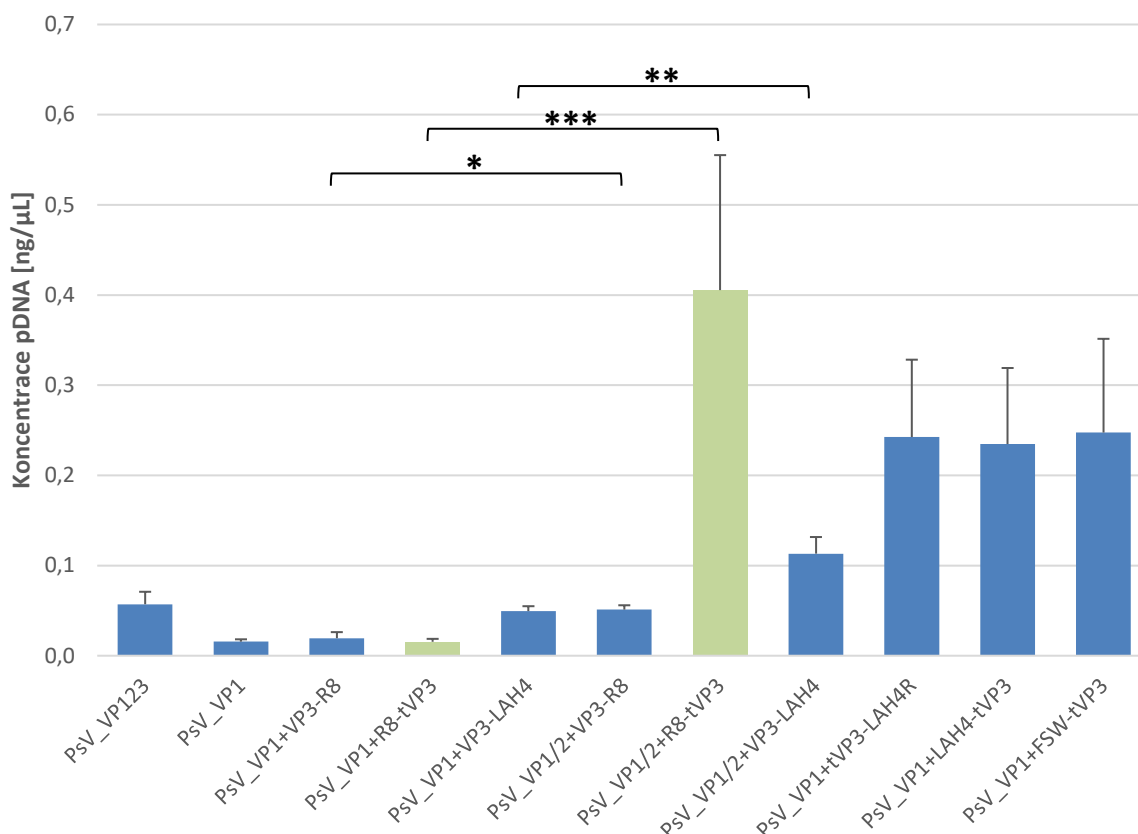
#### 5.2.4.1 Absolutní kvantifikace pDNA uvnitř částic

Stanovení množství enkapsidované pDNA probíhalo pomocí qPCR. Všechny vzorky byly ošetřeny DNázou TURBO, aby došlo k odstranění volně asociované DNA. Postup provedení je uveden v kapitole 4.2.7.3.

Data z qPCR byla vyhodnocena v softwaru LightCycler® 480 SW 1.5.1 (Roche). V tomto softwaru byla pomocí algoritmu pro vyhodnocení maxima 2. derivace vypočtena koncentrace pDNA. Pro výpočet průměrné koncentrace pDNA ze všech měření se vypočítal průměr hodnot replikátů ze všech ředění daného vzorku z alespoň třech nezávislých experimentů. Replikáty s odlehlými hodnotami koncentrace byly vyřazeny. Replikáty s abnormální křivkou tání DNA, které naznačovaly inhibici reakce, byly vyřazeny. Vyřazené replikáty nebyly do průměru zahrnuty. Získané zprůměrované koncentrace pDNA pro jednotlivé vzorky jsou zobrazeny v tabulce č. 7 a grafu č. 2.

Vzorek	Průměrná koncentrace pDNA (ng/μL)	SD	SEM	# průměrovaných hodnot	# nezávislých experimentů
PsV_VP123	0,057	0,031	0,014	5	3
PsV_VP1	0,016	0,005	0,003	4	3
PsV_VP1+VP3-R8	0,019	0,015	0,007	5	3
PsV_VP1+R8-tVP3	0,015	0,009	0,003	8	4
PsV_VP1+VP3-LAH4	0,049	0,012	0,005	5	3
PsV_VP1/2+VP3-R8	0,051	0,011	0,005	5	3
PsV_VP1/2+R8-tVP3	0,405	0,423	0,150	8	3
PsV_VP1/2+VP3-LAH4	0,113	0,041	0,018	5	3
PsV_VP1+tVP3-LAH4R	0,243	0,192	0,086	5	3
PsV_VP1+LAH4-tVP3	0,235	0,189	0,084	5	3
PsV_VP1+FSW-tVP3	0,247	0,232	0,104	5	3

**Tabulka 7: Průměrné koncentrace pDNA ve vzorcích pseudovirionů o stejné vstupní proteinové koncentraci (41,1 μg/mL)** - Sloupec s průměrnou koncentrací DNA vyjadřuje průměrnou hodnotu koncentrace ze všech ředění. Tabulka dále obsahuje výběrovou směrodatnou odchylku (SD) a střední chybu průměru (SEM). V tabulce je i znázorněn počet měřených replikátů vzorku nezávisle na ředění a počet nezávisle provedených experimentů pro konkrétní vzorek. Vzorky s nejvyšší a nejnížší koncentrací pDNA jsou pro snazší orientaci vyznačeny zeleně.



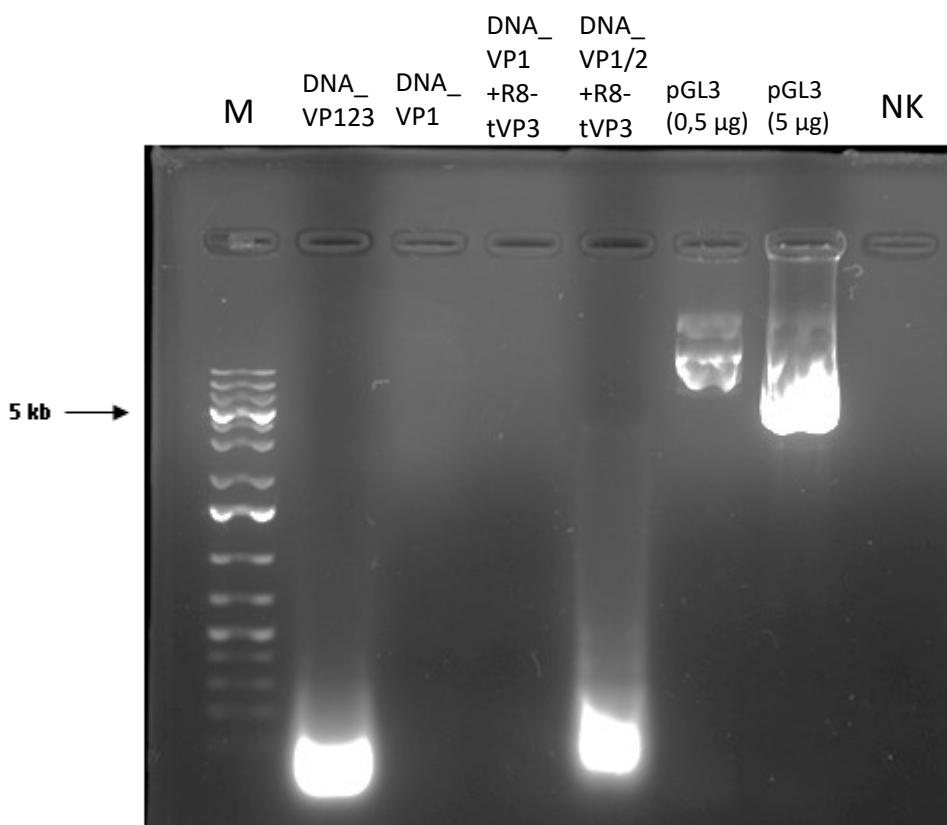
**Graf 2: Průměrné koncentrace pDNA vzorků o stejné vstupní proteinové koncentraci (41,1 μg/mL) získané z qPCR** - Data vychází z tabulky č. 7. Chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru (SEM). Vzorky s nejvyšší a nejnižší koncentrací pDNA jsou pro snazší orientaci vyznačeny zeleně (PsV\_VP1+R8-tVP3; PsV\_VP1/2+R8-tVP3). Porovnání stanovené koncentrace pDNA mezi variantami vzorků s VP2 a bez VP2 bylo provedeno pomocí oboustranného Mann-Whitneyho testu (pro varianty PsV s VP3-R8 a VP3-LAH4,  $n = 5$ ; pro varianty PsV s R8-tVP3,  $n = 8$ ). Hvězdička v grafu vyjadřuje dosaženou hladinu statistické významnosti (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Z grafu č. 2 vyplývá, že nejvíce pDNA obsahovaly modifikované částice PsV\_VP1/2+R8-tVP3 a nejméně pDNA obsahovala varianta těchto pseudovirionů se stejně modifikovaným VP3, avšak bez VP2. Největší variabilitu naměřeného množství DNA měly PsV\_VP1/2+R8-tVP3 spolu s pseudoviriony s modifikací tVP3-LAH4R, LAH4-tVP3 a FSW-tVP3. Částice, které obsahovaly navíc VP2, měly ve všech případech více zabalené pDNA než jejich varianty bez VP2. Statistická významnost byla prokázána mezi variantami vzorků s VP2, nebo bez VP2 (tj. PsV\_VP1+VP3-R8 a PsV\_VP1/2+VP3-R8,  $p < 0,01$ ; PsV\_VP1+R8-tVP3 a PsV\_VP1/2+R8-tVP3,  $p < 0,001$ ; PsV\_VP1+VP3-LAH4 a PsV\_VP1/2+VP3-LAH4,  $p < 0,01$ ). Při mnohonásobném porovnání (Kruskal-Wallisovým testem s post hoc testem Dunnové) naměřené koncentrace pDNA všech modifikovaných vzorků s kontrolním vzorkem PsV\_VP123 nebyly zjištěny statisticky signifikantní rozdíly ( $p > 0,05$ ).

#### 5.2.4.2 Extrakce plazmidu z pseudovirionů a její absolutní kvantifikace

Kvantifikace pDNA z kompletních pseudovirionů byla následně doplněna o srovnávací stanovení množství pDNA po extrakci této pDNA z vybraných variant pseudovirionů. Virové proteiny totiž mohly qPCR reakci inhibovat, i přestože program pro qPCR zahrnoval 10 minut dlouhou pre-inkubaci, která měla zajistit denaturaci proteinů a rozpad částic.

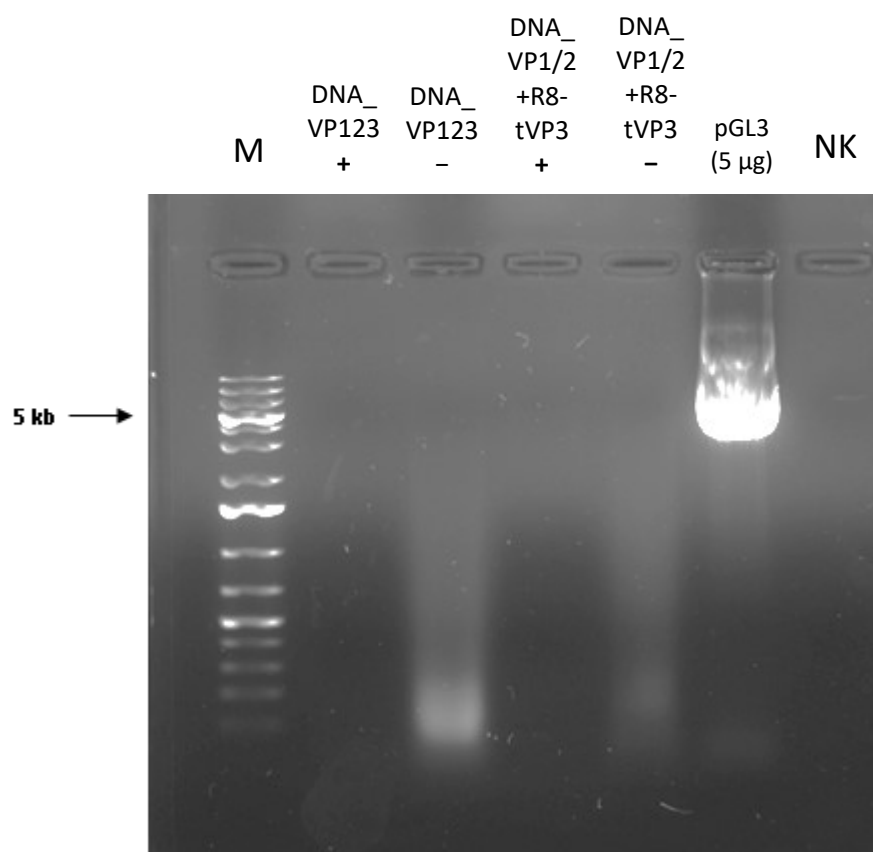
DNA nebyla izolována ze všech vzorků. Pro izolaci pDNA byly vybrány PsV\_VP123 (kontrolní nemodifikované částice), PsV\_VP1 (kontrolní nemodifikované částice bez minoritních kapsidových proteinů), PsV\_VP1+R8-tVP3 (vzorek s nejnižší naměřenou koncentrací DNA) a PsV\_VP1/2+R8-tVP3 (vzorek s nejvyšší naměřenou koncentrací pDNA). DNA byla izolována z 10 µg částic. Tyto částice byly před samotnou extrakcí DNA inkubovány s DNázou I. DNáza I byla následně inaktivována roztokem EDTA (pH = 8,0). Potom byly částice degradovány proteinázou K, a DNA byla poté izolována pomocí fenol-chloroformové extrakce.



**Obrázek 16: Snímek gelu po agaróзовé elektroforéze vzorků extrahované DNA** - Vzorky byly na gel dávány o stejném objemu 5 µL, kromě pozitivní kontroly pGL3. V případě vzorků pGL3 se na gel nanaslo 0,5 µg a 5 µg DNA. M označuje marker molekulových hmotností Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). NK představuje negativní kontrolu, kdy se na gel přidala demiH<sub>2</sub>O.

Po izolování DNA z částic se kvantita DNA ověřila na spektrofotometru ND-100 (NanoDrop Technologies). Největší výtěžek DNA byl získán z PsV\_VP123 a nejméně DNA se povedlo získat z PsV\_VP1+R8-tVP3 (data neuvedena). Dodatečně byla provedena agarózová elektroforéza těchto vzorků (viz obrázek 16).

Výsledek elektroforézy naznačoval, že množství reportérového plazmidu ve vzorcích extrahované DNA je menší než detekční citlivost metody. U vzorků s vyšším DNA výtěžkem, tj. DNA\_VP123 a DNA\_VP1/2+R8-tVP3, se objevil velmi jasný signál ve spodní části gelu. To naznačovalo, že vzorky extrahované DNA obsahovaly buď velké množství rozpadlé DNA, nebo RNA. Dalším postupem bylo zopakovat agarózovou elektroforézu pro vzorky, které vykazují vysoký obsah degradované DNA a ošetřit je RNázou A/T1. Šlo o zjištění, zda tento signál představuje opravdu DNA, či se jedná o RNA.



**Obrázek 17: Snímek gelu po agarózové elektroforéze vzorků extrahované DNA po ošetření RNázou -** Vzorky ošetřené RNázou A/T1 jsou označeny symbolem (+) a neošetřené symbolem (-). Na gel byly vzorky nanášeny o stejném objemu. Každý vzorek obsahoval 1,5 µL DNA, kromě pozitivní kontroly pGL3. V případě vzorků pGL3 se na gel nanaslo 5 µg DNA. M představuje marker molekulových hmotností Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). NK je negativní kontrola, kdy se na gel přidala pouze demiH<sub>2</sub>O.

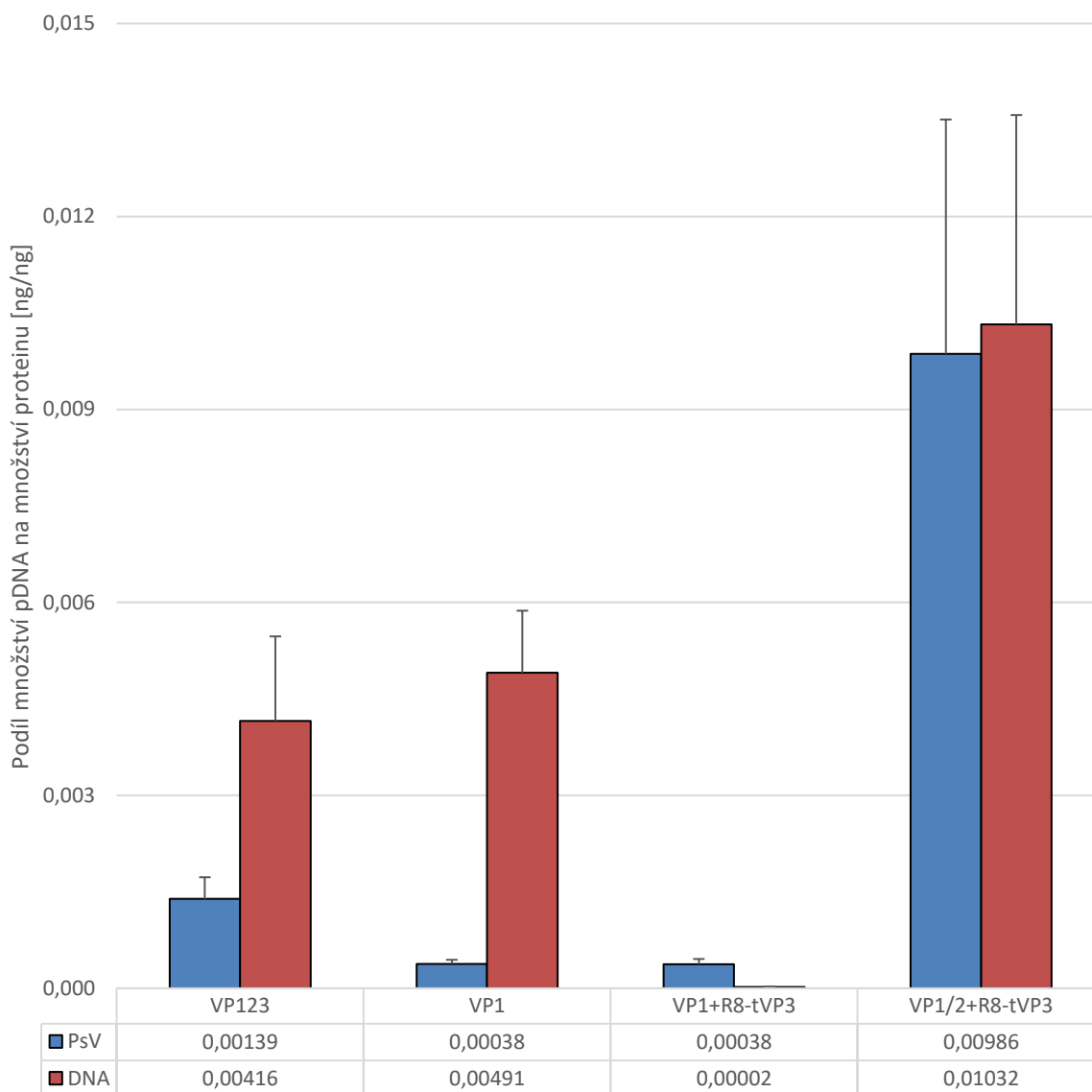
Z gelu na obrázku č. 17 bylo patrné, že u vzorků DNA\_VP123 a DNA\_VP1/2+R8-tVP3 byla detekována RNA a nikoliv DNA.

Vzhledem k tomu, že po extrakci pseudovirionů nebylo možné pomocí agarózové elektroforézy detekovat přítomnost kompletního pGL3-control, ověřila se přítomnost plazmidu prostřednictvím transformace izolované DNA do kompetentních bakterií a následnou selekcí. Zároveň tato metoda měla pomoci vyloučit možnost, že metoda qPCR detekuje pouze fragmenty vektoru, a nikoliv expresně funkční plazmid. Bakterie se po transformaci vysely na agarové plotny s ampicilinem (finální koncentrace 100 µg/mL). Výstupem experimentu byly mnohočetné kolonie bakterií na agarových plotnách se selekčním antibiotikem u všech zkoumaných vzorků (viz tabulka 8). Tím se potvrdilo, že vybrané vzorky po extrakci DNA obsahují funkční reportérový plazmid.

Objem nanášené suspenze bakterií na plotnu	DNA_VP123	DNA_VP1	DNA_VP1 +R8-tVP3	DNA_VP1/2 +R8-tVP3
10 µL	167	452	---	273
100 µL	---	---	10	---
Zbytek	---	---	69	---

**Tabulka 8: Množství kolonií na agarových plotnách s ampicilinem** - Na agar byly vysety transformované bakterie *E. coli* TOP10. Bakterie byly transformovány příslušným vzorkem extrahované DNA. „Zbytek“ představuje zbylý objem bakteriální suspenze, který byl nanesen na agar po odebrání 110 µL suspenze z předchozího nanášení. Oblast tabulky označená (---) představuje nezdokumentovaná data.

Posledním krokem bylo změřit absolutní množství reportérového plazmidu v těchto vzorkách pomocí qPCR. Metodika přípravy vzorků pro qPCR byla téměř identická přípravě pseudovirionů pro qPCR (viz kapitola 4.2.7.3). V tomto případě vzorky pochopitelně nebyly ošetřeny DNázou I.



**Graf 3: Porovnání podílů množství pDNA na množství proteinu, mezi vzorky po extrakci DNA a vzorky PsV (bez extrakce DNA)** - Hodnoty na ose Y jsou uvedené v jednotkách nanogram pDNA na nanogram proteinu daného vzorku. Průměrné hodnoty podílu množství pDNA na množství proteinu získané metodou qPCR pseudovirionů jsou označeny jako „PsV“ (modře). Chybové úsečky modrých sloupců představují střední chybu průměru (SEM) ze všech provedených experimentů (viz tabulka 7). Průměrné koncentrace pDNA získané metodou qPCR extrahované DNA z pseudovirionů jsou označeny jako „DNA“ (červeně). Chybové úsečky červených sloupců představují výběrovou směrodatnou odchylku (SD) z jediného provedeného experimentu. Tabulka hodnot je zobrazena pod grafem.

U kontrolních vzorků (DNA/PsV\_VP123/VP1) bylo po extrakci naměřeno vyšší množství DNA než při stanovování množství v kompletních pseudovirionech. K opačnému posunu hodnot došlo u vzorku s pouhým VP1 proteinem (DNA\_VP1). Po extrakci DNA bylo u tohoto vzorku pozorováno srovnatelné množství reportérového plazmidu jako u vzorku DNA\_VP123 po extrakci, zatímco při analýze kompletních pseudovirionů PsV\_VP123 vykazovaly více pDNA než PsV\_VP1. U vzorku VP1/2+R8-tVP3 nebyl pozorován výrazný posun v množství pDNA po extrakci. Vzorek VP1+R8-tVP3 měl o řád méně pDNA po



extrakci. Výsledky tohoto experimentu ukázaly, že přestože se zjištěné absolutní množství pDNA pro daný vzorek liší v závislosti na tom, zda byla DNA extrahována nebo ne, nedochází pravděpodobně při stanovení množství pDNA v kompletních pseudovirionech k nějaké systematické chybě, vlivem přítomnosti virových proteinů. Oběma metodami bylo zjištěno nejnížší množství pDNA v VP1+R8-tVP3 a nejvyšší u vzorku VP1/2+R8-tVP3. Proto byla pro normalizaci pseudoinfekce/transdukce v dalších experimentech využita výhradně data získaná pomocí stanovení pDNA z kompletních pseudovirionů, která na rozdíl od protokolu pro extrakci DNA z pseudovirionů vyžadovala jen malé množství vstupního materiálu (40 ng vs. 10 µg), navíc nevnikala do analýzy variabilitu spojenou s izolací DNA a byla provedena opakovaně.

### 5.3 Srovnání účinnosti transdukce pseudoviriony

Pro srovnání účinnosti, s jakou jsou jednotlivé modifikované PsV schopné přenášet do cílových buněk reportérový vektor s luciferázou, byl využit luciferázový test (viz kapitola 4.2.3.5). V rámci standardního testu byly jako cílové buňky využívány buňky 293TT (40 000 buněk/vzorek) a pseudoviriony o stejném množství DNA ( $m_{DNA} = 1,14$  ng/test). Pro normalizaci výsledků nebylo možné využívat například měření proteinové koncentrace, protože byla pro analýzu používána detekce luciferázy přímo v kultivačním médiu obsahujícím sérum. Proto se v rámci každého testu paralelně prováděl v replikátech také test životaschopnosti buněk (kapitola 4.2.3.4). Účelem změření životaschopnosti buněk tedy bylo normalizovat výsledky luciferázového testu právě na množství živých buněk po pseudoinfekci modifikovanými částicemi.

Celkem byly provedeny dva nezávislé experimenty. První experiment byl zaměřen na efektivitu transdukce částic, které nebyly ošetřeny DNázou I před pseudoinfekcí 293TT buněk. Druhý experiment byl cílen na účinnost transdukce částic, které byly před pseudoinfekcí ošetřeny DNázou I. Kompletní metodika od přípravy buněk 293TT na pseudoinfekci pseudoviriony až po samotný luciferázový test je podrobně zapsána v kapitolách 4.2.3.3 až 4.2.3.5. Účelem ošetření vzorků DNázou I před pseudoinfekcí buněk bylo sledovat pouze efektivitu transdukce částic, neboť, některé peptidy penetrující membrány mají potenciál podpořit transfekci volné DNA. DNáza I tak posloužila k odstranění volných molekul DNA, které nebyly zabaleny v kapsidách.

### 5.3.1 Luciferázový test

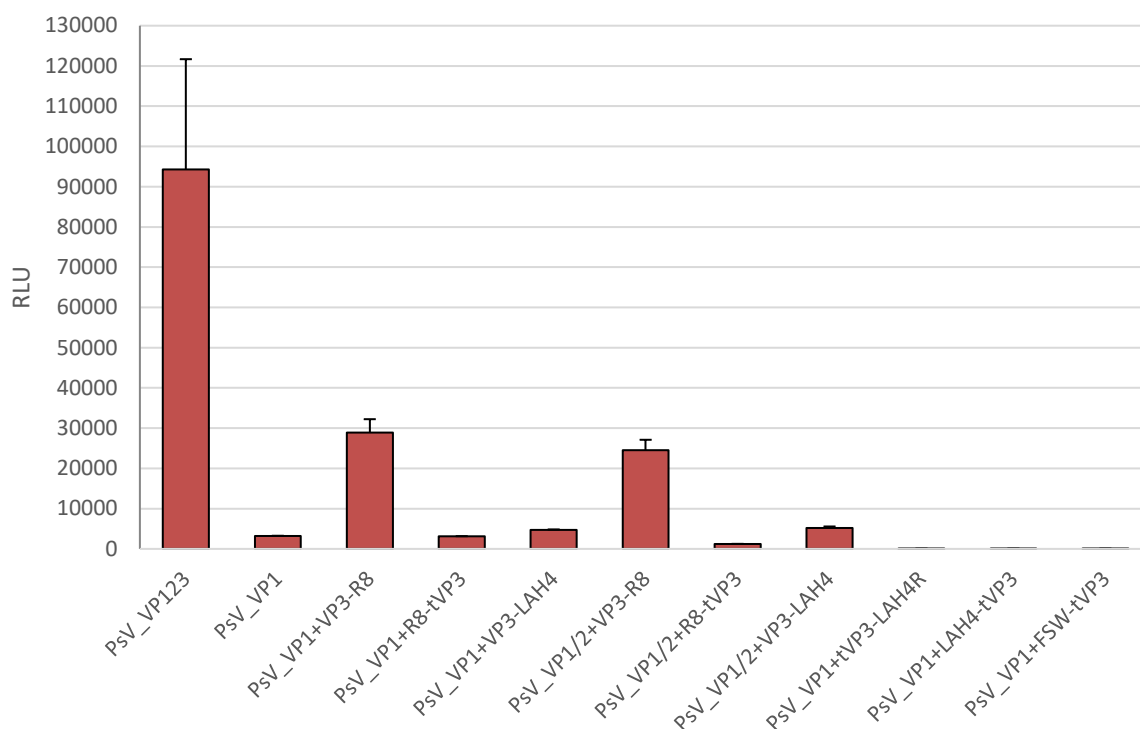
Při prvotních testech pseudoviriony nebyly před pseudoinfekcí inkubovány s DNázou I (viz tabulka 9 a graf 4). Každý vzorek byl připraven v heptaplikátu, z toho tři replikáty byly užity pro změření životaschopnosti buněk po pseudoinfekci a čtyři zbylé replikáty posloužily ke změření luciferázového signálu.

Vzorek	LU	RLU	SD	Životaschopnost buněk
PsV_VP123	185663	94317	27365,994	1,969
PsV_VP1	6333	3217	47,855	1,969
PsV_VP1+VP3-R8	70154	28912	3317,462	2,427
PsV_VP1+R8-tVP3	6857	3125	41,177	2,195
PsV_VP1+VP3-LAH4	10241	4701	131,434	2,179
PsV_VP1/2+VP3-R8	51256	24530	2583,463	2,090
PsV_VP1/2+R8-tVP3	2588	1241	12,050	2,085
PsV_VP1/2+VP3-LAH4	11249	5178	392,406	2,173
PsV_VP1+tVP3-LAH4R	147	77	0,015	1,922
PsV_VP1+LAH4-tVP3	142	76	0,026	1,862
PsV_VP1+FSW-tVP3	159	77	0,007	2,069
NK	104	73	0,016	1,437

**Tabulka 9: Tabulka získaných a vypočtených dat znázorňujících efektivitu transdukce pseudovirionů neošetřených DNázou I** - NK je negativní kontrola, kdy během pseudoinfekce k buňkám nebylo přidáno inokulum, ale pouze čiré medium. Sloupec „LU“ (LU = luciferázová jednotka) ukazuje průměrnou naměřenou hodnotu luciferázového signálu tetraplikátu příslušného vzorku. Sloupec „RLU“ (RLU = relativní luciferázová jednotka) ukazuje normalizovanou průměrnou hodnotu luciferázového signálu na životaschopnost buněk. Výpočet  $RLU = LU \div \text{„Životaschopnost buněk“}$ . Sloupeček „SD“ vyjadřuje výběrovou směrodatnou odchylku. Poslední sloupeček ukazuje průměrnou hodnotu životaschopnosti buněk. Průměrná hodnota životaschopnosti buněk po inkubaci s Tritonem X-100 činila 0,256 (v tabulce tato hodnota není zobrazena).

Míra životaschopnosti buněk infikovaných pseudoviriony poukazuje na nízkou cytotoxicitu těchto částic.

Z tohoto experimentu bylo zjištěno, že nejúčinnějším vektorem pro dopravu reportérového genu do jádra byly kontrolní nemodifikované pseudoviriony obsahující všechny tři kapsidové proteiny (PsV\_VP123). Tedy částice nejvíce podobné MPyV. Žádný z modifikovaných pseudovirionů nevykazoval vyšší účinnost transdukce než kontrolní PsV\_VP123.



**Graf 4: Graf efektivity transdukce PsV pro buňky 293TT bez ošetření DNázou I** – Graf vychází z tabulky č. 9. Osa y znázorňuje hodnotu bioluminiscence normalizovanou na životaschopnost buněk. Tato hodnota byla zapsána v relativních luciferázových jednotkách (RLU). Chybové úsečky znázorňují výběrovou směrodatnou odchylku (SD), která vychází z hodnot luciferázového signálu tetraplikátu příslušného vzorku.

### 5.3.2 Luciferázový test (s DNázou I)

Druhý experiment byl proveden s ošetřením částic DNázou I před pseudoinfekcí. DNáza I posloužila k odstranění volných DNA molekul, které nebyly zabaleny v kapsidách, ale mohly se nespecificky dostávat do buněk. Přičemž DNáza I nebyla po použití nijak inaktivována. Při pseudoinfekci buněk 293TT tak bylo k buňkám přidáno inokulum částic s DNázou I. Pro srovnání účinku DNázy I na transdukční potenciál v rámci jednoho experimentu byly použity kontrolní nemodifikované PsV\_VP123: byly aplikovány na buňky ve dvou variantách - bez ošetření DNázou I, a po ošetření DNázou I. Získané výsledky jsou prezentovány v tabulce č. 10.

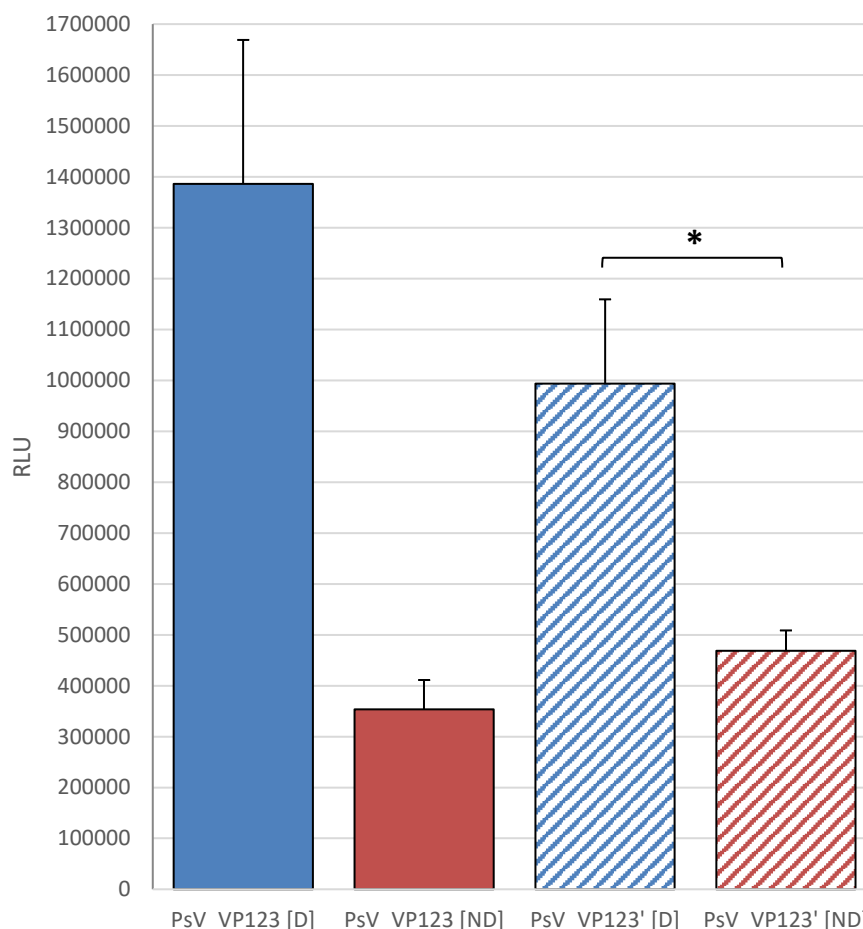
Vzorek	LU	RLU	SD	Životaschopnost buněk
PsV_VP123 [D]	1598358	1386260	282718,513	1,153
PsV_VP123 [ND]	539924	353585	57677,019	1,527
PsV_VP1	242	151	0,010	1,602
PsV_VP1+VP3-R8	1839	1268	1,088	1,450
PsV_VP1+R8-tVP3	452	300	0,105	1,508
PsV_VP1+VP3-LAH4	267	167	0,019	1,602
PsV_VP1/2+VP3-R8	146	91	0,006	1,610
PsV_VP1/2+R8-tVP3	70	44	0,001	1,593
PsV_VP1/2+VP3-LAH4	4190	2756	10,251	1,520
PsV_VP1+tVP3-LAH4R	92	60	0,001	1,553
PsV_VP1+LAH4-tVP3	65	39	0,001	1,676
PsV_VP1+FSW-tVP3	42	28	0,000	1,508
NK	43	20	0,000	2,123
PsV_VP123' [D]	1324483	993859	165550,932	1,333
PsV_VP123' [ND]	680153	468856	39997,810	1,451
NK'	425	230	0,059	1,852

**Tabulka 10: Tabulka získaných a vypočtených dat znázorňujících efektivitu transdukce pseudovirionů ošetřených DNázou I** - Všechny modifikované částice byly ošetřeny DNázou I, kromě vzorku PsV\_VP123. Vzorek PsV\_VP123 byl připraven ve dvou variantách, ošetřený a neošetřený DNázou I. Pokud je PsV\_VP123 označen jako [D], jedná se o variantu ošetřenou DNázou I. Označení [ND] vyjadřuje, že PsV\_VP123 nebyly ošetřeny DNázou I. NK je negativní kontrola, kdy během pseudoinfekce k buňkám nebylo přidáno inokulum, ale pouze čiré DMEM. Sloupec „LU“ (LU = luciferázová jednotka) ukazuje průměrnou naměřenou hodnotu luciferázového signálu tetraplikátu příslušného vzorku. Sloupec „RLU“ (RLU = relativní luciferázová jednotka) ukazuje normalizovanou průměrnou hodnotu luciferázového signálu na životaschopnosti buněk. Výpočet  $RLU = LU \div \text{„Životaschopnost buněk“}$ . Sloupeček „SD“ vyjadřuje výběrovou směrodatnou odchylku k RLU tetraplikátu vzorku. Poslední sloupeček ukazuje průměrnou hodnotu životaschopnosti buněk. Průměrná hodnota životaschopnosti buněk po inkubaci s Tritonem X-100 činila 0,238 (v tabulce tato hodnota není zobrazena). Šedě značená spodní oblast tabulky představuje výsledky získané ze separátního experimentu, který probíhal současně s tím původním.

Buňky vykazovaly nižší životaschopnost, pokud byly infikovány. Navíc vzorky částic, jejichž hodnota LU byla nejvyšší (PsV\_VP123 [D]), měly zároveň nejvyšší cytotoxický efekt na buňky. Je to patrné z hodnot životaschopnosti buněk. Nejvyšší účinnost transdukce podle tabulky č. 10 vykazovaly nemodifikované částice ošetřené DNázou I (PsV\_VP123 [D]). U všech ostatních vzorků ošetřených DNázou I byla naměřená aktivita luciferázy velmi nízká.

Srovnání efektivit transdukce mezi vzorky (PsV\_VP123) ošetřenými DNázou I [D] a neošetřenými DNázou I [ND] provedené paralelně na dvou deskách je vyobrazeno v grafu č. 5. Ze získaných dat je zřejmé, že ošetření DNázou I zvýšilo efektivitu transdukce. Graf dokumentuje variabilitu měření při opakování a mezi jednotlivými deskami. Zatímco na první desce vzorky neošetřené DNázou I měly o 74 % menší účinnost transdukce než vzorky ošetřené DNázou I ( $p = 0,057$ ), na druhé desce byla zaznamenána účinnost transdukce

neošetřených vzorků menší o 53 % než u vzorků ošetřených DNázou I ( $p = 0,029$ ). Účinnost transdukce byla v případě vzorků ošetřených DNázou I signifikantně vyšší pouze u druhé desky ( $p < 0,05$ ).



**Graf 5: Graf porovnávající efektivitu transdukce mezi vzorky PsV\_VP123 ošetřenými, nebo neošetřenými DNázou I pro buňky 293TT** - Osa y znázorňuje hodnotu bioluminiscence normalizovanou na životaschopnost buněk. Tato hodnota byla zapsána v relativních luciferázových jednotkách (RLU). Vzorky, jejichž hodnoty jsou v grafu znázorněny barevnou výplní, pochází z experimentu, při kterém byly vyhodnocovány i vzorky modifikovaných pseudovirionů ošetřených DNázou I. Vzorky, jejichž hodnoty jsou v grafu znázorněny barevným vzorem, vychází z dat naměřených z jiné desky. Modrá barva označuje vzorky ošetřené DNázou I, zatímco červená barva označuje vzorky, které nebyly ošetřeny DNázou I. Chybové úsečky znázorňují výběrovou směrodatnou odchylku. Data byla analyzována oboustranným Mann-Whitneyho testem ( $n = 4$ ). Hvězdička v grafu vyjadřuje statistickou významnost ( $*p < 0,05$ ).

## 6. Diskuse

V laboratoři virologie se dlouhodobě studuje využití virových částic odvozených od polyomavirů pro diagnostiku, vývoj vakcín a návrh dopravních systémů pro dopravu léčiv a terapeutických genů do cílových buněk. Virové částice odvozené od MPyV mají větší potenciál využití v medicíně než lidské polyomaviry. Důvodem je, že MPyV nezpůsobují produktivní infekci u lidí. To naznačuje, že se v lidské populaci nevyskytují protilátky proti MPyV (A. Hejtmánková, nepublikovaná data), které by interferovaly s potenciálním medicínálním využitím těchto částic.

Cílem této práce bylo připravit modifikované částice odvozené od MPyV, které by vykazovaly vyšší účinnost při přepravě genů do buněk než částice nemodifikované. Pro tento účel byly použity CPP jejichž efekt zvyšovat transdukční potenciál u modifikovaných virových částic je široce popsán v odborné literatuře (Chen *et al.*, 2011; Eguchi *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2011). V laboratoři virologie jsou částice odvozené od MPyV povrchově modifikovány CPP nekovalentně i kovalentně. Povrchová modifikace pomocí CPP tak může ovlivňovat způsob internalizace do buněk (Váňová *et al.*, 2019). Avšak v této práci byla popsána modifikace částic tvorbou rekombinantního minoritního kapsidového proteinu fúzovaného se sekvencí vybraného CPP. Minoritní kapsidové proteiny jsou inkorporovány dovnitř kapsidy (Chen *et al.*, 1998), a proto je nepravděpodobné, aby modifikace ovlivnila způsob internalizace částic do buněk. Specificky byl vybrán protein VP3, neboť je kratší variantou VP2. Případné prodloužení proteinové sekvence VP3 pomocí CPP by proto nemělo stericky bránit enkapsidaci DNA. Současně, oproti VP2, VP3 neobsahuje HD1, doménu pravděpodobně zodpovědnou za únik částice z ER (Huérffano *et al.*, 2017). V této práci byla využita pro ukotvení CPP do virové částice i zkrácená forma VP3 (tVP3), která postrádá prvních 99 AA zahrnující předpokládanou HD2, která pravděpodobně umožňuje vazbu proteinu k membráně ER (Huérffano *et al.*, 2017). Předpokladem bylo, že inkorporace CPP do sekvence VP3 má potenciál nahradit a případně i zlepšit předpokládanou funkci těchto domén.

Pro tuto práci byly vybrány tři různé CPP: kationický polyarginin (i), kationický amfipatický peptid bohatý na histidin, LAH4 (ii) a potenciálně nový amfipatický peptid pocházející od adenovirů, FSW (iii). Příslušný peptid byl umístěn buď na N-konci proteinu tVP3 (R8-tVP3; LAH4-tVP3; FSW-tVP3), nebo na C-konci VP3 (VP3-R8; VP3-LAH4). Dodatečně byl připraven tVP3, který byl na C-konci fúzovaný s invertovanou sekvencí LAH4

peptidu (tVP3-LAH4R). Veškerá data byla získána a analyzována z jediného izolátu pseudovirionů.

Všechny pseudoviriony se povedlo úspěšně izolovat a nasnímat na transmisním elektronovém mikroskopu (viz výsledky 5.2.1). Ze snímků TEM bylo zjištěno, že kontrolní pseudoviriony PsV\_VP123 měly v porovnání se všemi ostatními vzorky nejmenší zastoupení částic. Toto zjištění také korelovalo s nejmenší naměřenou hodnotou proteinové koncentrace (viz výsledky 5.2.2). Nižší zastoupení proteinů, a tedy i částic, u tohoto vzorku bylo pravděpodobně způsobeno suboptimálními podmínkami při izolaci těchto částic, neboť při opakované produkci a izolaci těchto částic provedených v laboratoři virologie (data neuvedena) byly již zaznamenány vyšší výtěžky virových proteinů.

Na snímcích vzorků PsV\_VP1, PsV\_VP1+VP3-R8, PsV\_VP1/2+VP3-LAH4, PsV\_VP1+tVP3-LAH4R a PsV\_VP1+FSW-tVP3 byly mimo samotných částic pozorovány tubulární struktury. Tyto struktury byly pozorovány i v dalších studiích při purifikaci viru MPyV (Baker *et al.*, 1983; Erickson *et al.*, 2012). Analýzou tubulů ze snímků se zjistilo, že průměr tubulů se pohyboval v rozmezí 45 nm až 50 nm. Ve studii od Baker *et al.* (1983) byly pozorovány podobné tubulární struktury s průměrem 45 - 55 nm, které byly tvořeny pentamery VP1 v hexamerním uspořádání. Erickson *et al.* (2012) pak nabízí teorii, že tyto tubuly napomáhají inkorporovat DNA do nově vznikající částice, kdy je DNA spolu s histony vedena vnitřkem tubulu, přičemž na konci tubulu by mohlo docházet k tzv. „pučení“ nových virionů. Přítomnost tubulů ve vzorku by tak mohla přispívat k vyššímu množství enkapsidované DNA v takto vznikajících částicích. V rámci této diplomové práce nebylo bohužel možné z časových důvodů provést izolace opakovaně, aby bylo možné potvrdit, že by zvýšená přítomnost tubulárních struktur vedla k vyššímu množství enkapsidované DNA (viz kapitola 5.2.1 a 5.2.4.1).

Data z naměřených hodnot velikostí pseudovirionů nasvědčují, že přítomnost minoritních kapsidových proteinů pravděpodobně snižuje rozpětí velikosti částic. Porovnáním variant pseudovirionů s VP2 a bez VP2 bylo pozorováno, že došlo ke snížení rozpětí velikosti částic u varianty pseudovirionů obsahující navíc VP2. Pro potvrzení tohoto trendu by opět bylo nutné provést izolace a analýzy opakovaně, nicméně na základě dat získaných kvantifikací reportérového plazmidu uvnitř částic je možné dokonce formulovat hypotézu, že snížení variability ve velikosti částic (přítomností VP2) může potenciálně vést k enkapsidaci vyššího množství pDNA (viz tabulka 11).

Detekci pseudovirionů ze snímků TEM společně s provedenou analýzou kvality proteinů byla u všech vzorků potvrzena přítomnost hlavního kapsidového proteinu, VP1.

Avšak přítomnost minoritních kapsidových proteinů se povedla ověřit jen u některých vzorků. Konkrétně u vzorků PsV\_VP1/2+VP3-R8, PsV\_VP1/2+R8-tVP3, PsV\_VP1/2+VP3-LAH4 a PsV\_VP1+LAH4-tVP3 se přítomnost minoritních kapsidových proteinů nepodařila zcela ověřit. To bylo pravděpodobně zapříčiněno velmi nízkým zastoupením minoritních kapsidových proteinů v těchto vzorcích, což naznačuje, že množství minoritních kapsidových proteinů bylo právě u těchto vzorků pod detekčním limitem příslušné metody. Jak u VP2, tak u VP3 proteinu se předpokládá, že obsahují hydrofobní oblasti (Barouch a Harrison, 1994; Chen *et al.*, 1998; Huérfano *et al.*, 2017). Tento předpoklad tak potenciálně mohl vést k neochotě těchto proteinů, především pak VP2, se přenést na nitrocelulóзовou membránu (nepublikovaná data laboratoře virologie). Dodatečně byl proto gel po proteinové elektroforéze obarven komerčním roztokem za účelem detekovat proteiny s vysokou citlivostí (detekce již 3 ng proteinu), které se nepřenesly na membránu. Ani v tomto případě se nepovedlo ověřit přítomnost minoritních kapsidových proteinů u těchto vzorků (data neuvedena). Toto zjištění tak poukazuje na nízké množství minoritních kapsidových proteinů. Studie od Stamatose *et al.* (1987) popisuje, že exprese rekombinantních strukturních proteinů v myších embryonálních fibroblastech je doprovázena akumulací těchto proteinů v blízkosti jaderné membrány. Současně tato studie popisuje, že určitá část strukturních proteinů, která se neakumulovala v blízkosti jádra, je v buňce degradována. Je možné se domnívat, že rekombinantní minoritní proteiny produkované v buněčné linii 293TT byly v buňkách obdobně degradovány ve vyšší míře, což mohlo potenciálně vést k suboptimálním proteinovým výtěžkům.

Pro ověření přítomnosti modifikovaného proteinu uvnitř pentameru podle modelu, který navrhl Chen *et al.* (1998), byl vybrán vzorek PsV\_VP3-LAH4, který byl purifikován opětovnou izolací v sacharózovém gradientu (data neuvedena) a následně analyzován pomocí hmotnostního spektrometru. Touto metodou se povedlo ověřit přítomnost VP3 uvnitř pentameru (data neuvedena). Nicméně přítomnost CPP v AK sekvenci modifikovaného VP3 se touto analýzou ověřit nepodařilo (data neuvedena), přestože byl vzorek před analýzou purifikován opětovnou izolací částic v sacharózovém gradientu. Toto zjištění poukazuje na náročnost důkladné analýzy minoritních kapsidových proteinů v komplexu s pentamerem VP1 (nezveřejněná data laboratoře virologie; Chen *et al.*, 1998).

Za účelem kvantifikovat množství enkapsidované pDNA pro všechny vzorky byla provedena qPCR s využitím specifických primerů (viz kapitola 4.2.7.3). Porovnáním dvou metodik kvantifikace pDNA: pDNA byla nejprve extrahována z pseudovirionů, a poté kvantifikována (i); stanovením množství pDNA z kompletních pseudovirionů (ii), bylo



zjištěno, že přítomnost denaturovaných virových proteinů pravděpodobně nevznáší žádnou systematickou chybu při kvantifikaci plazmidu. Na základě těchto dat bylo upřednostněno použití metodiky kvantifikace pDNA z kompletních pseudovirionů bez nutnosti extrahovat DNA, neboť tato metodika významně snížila spotřebu vstupního materiálu vyžadovaného pro tuto analýzu (viz kapitola 5.2.4.2).

Celistvost a funkčnost enkapsidovaného plazmidu byla ověřena extrakcí z pseudovirionů, poté transfekcí extraktu do kompetentních bakterií, a s ní spojenou selekcí na agarových plotnách se selekčním antibiotikem. U všech pozorovaných vzorků (DNA\_VP123, DNA\_VP1, DNA\_VP1+R8-tVP3 a DNA\_VP1/2+R8-tVP3) se na agarových plotnách objevily rezistentní kolonie (viz tabulka 8), což naznačuje, že reportérový plazmid se enkapsidoval do částic celý a současně byl schopný exprimovat gen pro rezistenci proti vybranému antibiotiku.

Analýzou extrahované DNA pomocí agaróзовé elektroforézy (viz kapitola 4.2.6.2) byla pozoruhodně detekována RNA, a to výjimečně u vzorků s VP2 (DNA\_VP123 a DNA\_VP1/2+R8-tVP3). Na základě tohoto zjištění se předpokládá, že RNA mohla být před extrakcí enkapsidována v pseudovirionech, kde byla potenciálně chráněna proteinovou kapsidou před degradací vnějšími vlivy (např. RNázami). Možnost, že RNA může být enkapsidována je navíc podpořena studií od Slilatyho *et al.* (1982), kde se podařilo enkapsidovat rRNA v *in vitro* experimentu do VLP odvozených od MPyV. Současně se zdá, že právě přítomnost VP2 pravděpodobně umožnila enkapsidaci RNA, neboť u zbylých dvou analyzovaných vzorků bez VP2 nebyla RNA elektroforézou detekována.

Analýzou hodnot naměřeného množství enkapsidované pDNA bylo zjištěno, že od kontrolního vzorku PsV\_VP123 se nejvíce odlišoval vzorek PsV\_VP1/2+R8-tVP3, který vykazoval až 7x více enkapsidované pDNA než kontrolní vzorek PsV\_VP123. Naopak vzorky PsV\_VP1 a PsV\_VP1-R8-tVP3 měly až 4x méně enkapsidované pDNA než kontrolní vzorek PsV\_VP123. Avšak při mnohonásobném porovnání hodnot množství enkapsidované pDNA všech zkoumaných vzorků vůči kontrolnímu vzorku PsV\_VP123 pomocí Kruskal-Wallisového testu s post hoc testem Dunnové nebyly při nízkém počtu měření zaznamenány mezi vzorky statisticky významné rozdíly ( $p > 0,05$ ). Zajímavé však je, že varianty modifikovaných pseudovirionů s VP2 měly vždy vyšší množství enkapsidované pDNA než varianty částic bez VP2 ( $p < 0,05$ ). To by mohlo naznačovat, že přítomnost minoritních kapsidových proteinů pravděpodobně napomáhá enkapsidaci pDNA.

Tyto výsledky naznačují, že ačkoliv analýzou kvality proteinů se nepodařilo ověřit přítomnost minoritních kapsidových proteinů u některých vzorků, zdá se, že tyto proteiny

mohly být ve vzorku přesto přítomné, alespoň v minimálním množství, vzhledem k jejich potenciálnímu efektu na zvýšení množství enkapsidovaného plazmidu. To platí především pro vzorek PsV\_VP1/2+R8-tVP3, u kterého byl pozorován nejvýraznější posun v množství enkapsidovaného plazmidu, oproti variantě tohoto vzorku bez VP2 ( $p < 0,001$ ). Množství enkapsidovaného plazmidu u částic modifikovaných R8-tVP3 s VP2 bylo 27x vyšší než u varianty bez VP2. Na základě těchto dat se proto dá usuzovat, že přítomnost minoritních proteinů je sice důležitá, ale jejich nízké zastoupení v kapsidě by mohlo paradoxně zvyšovat schopnost enkapsidace reportérového plazmidu. To by mohlo znamenat, že pro efektivní enkapsidaci DNA není potřeba, aby byly všechny pentamery virové částice obsazeny minoritním proteinem. Naopak je možné, že nižší obsazenost pentamerů minoritními proteiny vytváří více prostoru pro enkapsidaci DNA.

Dále bylo pozorováno, že částice s modifikovaným zkráceným VP3 (tVP3), až na jedinou výjimku pseudovirionů s R8-tVP3 modifikací, obsahovaly vyšší množství enkapsidovaného plazmidu. Je pravděpodobné, že kratší varianta VP3 vytváří více prostoru uvnitř kapsidy pro snazší enkapsidaci DNA. Je také možné, že velmi nízké množství enkapsidovaného plazmidu u varianty částic vzorku PsV\_VP1+R8-tVP3 mohlo být potenciálně ovlivněno enkapsidací buněčné DNA na úkor enkapsidace pDNA. Literatura uvádí, že DNA se enkapsiduje do částic nespecificky (Forstová *et al.*, 1995; Spanielová *et al.*, 2014). Podle Gillocka *et al.* (1997) exprese rekombinantního VP1 MPyV v bakulovirovém expresním systému vedla k enkapsidaci buněčných fragmentů DNA společně s histony. To vysvětluje, proč byly detekovány proteiny o velikosti histonů (11 - 15 kDa) v kontrolním vzorku VLP\_VP123 (viz obrázek 15A), neboť tyto kontrolní částice byly produkovány v bakulovirovém expresním systému. Avšak předpoklad, že k enkapsidaci buněčných fragmentů DNA dochází i během exprese kapsidových proteinů v buněčné linii 293TT nebyl v této práci ověřen.

Dále se předpokládalo, že kationický peptid, jako je polyarginin a LAH4, vytváří komplex se záporně nabitou DNA (Suwalsky a Traub, 1972), což může potenciálně vést k usnadnění enkapsidace DNA. Na tomto základě lze očekávat, že může dojít k enkapsidaci jakékoliv DNA, včetně buněčné DNA, anebo dokonce RNA (viz kapitola 5.2.4.2). Určení, zda příslušný CPP měl významný vliv na enkapsidaci pDNA do pseudovirionů, nelze ze získaných dat jednoznačně určit. Zdá se, že enkapsidace může být ovlivněna mnoha faktory, jako je množství minoritních proteinů v systému; přítomností VP2; přítomností VP3, nebo tVP3; vybraným CPP; umístěním CPP na VP3/tVP3 (C-konec, nebo N-konec).

Pro stanovení účinnosti transdukce izolovaných pseudovirionů byla provedena pseudoinfekce buněčné linie 293TT. Množství transdukovaného reportérového genu bylo následně vyhodnoceno na základě dat získaných z luciferázového testu a normalizováno podle testu životaschopnosti buněk. Při celkovém zhodnocení této analýzy se nezdá, že by vzorky modifikovaných pseudovirionů působily cytotoxicky na buňky 293TT (viz tabulky 9 a 10). Nicméně při analýze životaschopnosti buněk po pseudoinfekci se ukazuje, že přítomnost DNázy I pravděpodobně působí cytotoxicky na buňky. Buňky pseudoinfikované pseudoviriony, které byly ošetřeny DNázou I vykazovaly menší životaschopnost buněk než buňky, ke kterým se DNáza I nedostala (viz tabulka 10). To by současně vysvětlovalo, proč negativní kontrola v experimentu kde se analyzovaly pseudoviriony ošetřené DNázou I měla nejvyšší hodnotu životaschopnosti buněk (viz tabulka 10). K buňkám negativní kontroly bylo v době nanášení ošetřených pseudovirionů přidáno médium bez DNázy I.

Přestože byla u většiny vzorků modifikovaných pseudovirionů zjištěna vyšší koncentrace enkapsidované pDNA než u kontrolních pseudovirionů PsV\_VP123, efektivita transdukce modifikovaných částic byla ve všech případech výrazně nižší oproti kontrolním nemodifikovaným pseudovirionům PsV\_VP123. Nejvyšší naměřená účinnost transdukce mezi modifikovanými pseudoviriony byla naměřena pro vzorky obsahující polyarginin na C-konci nezkráceného VP3. Za předpokladu, že se v daném experimentu uvažuje účinnost kontrolních částic PsV\_VP123 za 100%, pak varianta pseudovirionů s modifikací VP3-R8 a s VP2 vykazovala pouze 26% účinnost transdukce kontrolního vzorku PsV\_VP123. Varianta bez VP2, s ověřenou přítomností VP3, měla 31% účinnost transdukce kontrolního vzorku PsV\_VP123.

Provedením stejné analýzy pro vzorky inkubované s DNázou I byla transdukční schopnost všech modifikovaných pseudovirionů plně potlačena. Jediné pseudoviriony schopné po inkubaci s DNázou I transdukovat reportérový plazmid byly kontrolní PsV\_VP123. Pozoruhodně bylo zjištěno, že vzorky PsV\_VP123, které nebyly ošetřeny DNázou I ve stejném experimentu, vykazovaly až o řád nižší účinnost transdukce než PsV\_VP123 ošetřené DNázou I. DNáza I v tomto případě tedy pravděpodobně stimulovala transdukční schopnost nemodifikovaných pseudovirionů PsV\_VP123. Jelikož DNáza I nebyla inaktivována před zahájením pseudoinfekce 293TT buněk, je možné, že DNáza I interferovala s internalizací pseudovirionů do 293TT buněk. Studie od Hitchcocka (1980) popisuje, že DNáza I interferuje s buněčným aktinem a způsobuje jeho depolymeraci. Současně existují poznatky, že přítomnost činidla pro depolymerizaci aktinu zvyšuje infekčnost MPyV (Gilbert *et al.*, 2003; Zila *et al.*, 2014). DNáza I tak pravděpodobně svou schopností depolymerovat

aktin podpořila efektivitu transdukce kontrolních pseudovirionů (PsV\_VP123). Jelikož obdobný efekt nebyl pozorován i u zbylých vzorků, je pravděpodobné, že modifikované pseudoviriony nezískaly očekávanou schopnost unikat po internalizaci z endozomální dráhy efektivně, ale naopak tato modifikace měla negativní vliv na směřování virových částic na produktivní dráhu vedoucí do jádra. V takovém případě se dá předpokládat, že data, která byla získána z luciferázového testu po pseudoinfekci modifikovanými pseudoviriony neošetřenými DNázou I mohou odrážet spíše účinnost transfekce nezabalené pDNA ve vzorku, která byla během následného luciferázového testu zahrnující ošetření DNázou I plně degradována. To by znamenalo, že modifikované pseudoviriony nebyly schopné uniknout z endozomálního kompartmentu a dopravit enkapsidovanou pDNA do jádra.

Významnou problematikou při vytváření účinného transdukčního systému může být neschopnost transdukovaných molekul uniknout po endocytóze z endozomálního kompartmentu, což ve výsledku vede k degradaci endocytovaného materiálu v lysozómu. CPP v mnoha případech umožňují překonat tuto bariéru pro mnohé molekuly jako je RNA, DNA nebo proteiny (Endoh a Ohtsuki, 2009; Kichler *et al.*, 2003; Moulay *et al.*, 2017; Ramakrishna *et al.*, 2014). Nicméně v případě nanočástic je tato schopnost CPP rozporuplná, především pak pro polyargininy. Některým studiím se povedlo zaznamenat endozomální únik u nanočástic povrchově modifikovaných polyargininem (El-Sayed *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2011). Jiné studie popisují, že k úniku došlo až po dopravení povrchově modifikované nanočástice do lysozómu (Luo *et al.*, 2019). Existují však i studie, které popisují, že po kovalentním navázání polyargininu k jiné molekule, nebo nanočástici zůstával tento komplex uvězněn v endozomálním kompartmentu (Maiolo *et al.*, 2005; Ruan *et al.*, 2007). V této diplomové práci nebyl proveden experiment, který by porovnal schopnost modifikovaných a nemodifikovaných částic unikat z endozomálního kompartmentu. Naměřené nízké hodnoty účinnosti transdukce nicméně nenasvědčují tomu, že by modifikace VP3/tVP3 pomocí CPP nějak přispívala ke zlepšení schopnosti unikat z endozomálního kompartmentu.

Modifikace minoritního kapsidového proteinu se by mohla mít daleko významnější úlohu až v ER, kde pravděpodobně dochází vlivem aktivity oxidoreduktáz k masivním konformačním změnám kapsidy a k odhalení minoritních proteinů, což umožňuje jejich interakci s vnitřní membránovou vrstvou ER (Huerfano *et al.*, 2010; Magnuson *et al.*, 2005; Rainey-Barger *et al.*, 2007). Za následnou interakci minoritních proteinů s membránou ER jsou pravděpodobně zodpovědné hydrofobní domény minoritních proteinů (Huérano *et al.*, 2017). Výsledky získané z luciferázového testu ukázaly, že pseudoviriony s modifikovaným

VP3 vykazovaly mírně vyšší transdukční potenciál než pseudoviriony s tVP3. Zkrácená forma VP3, tVP3, neobsahovala N-koncovou hydrofobní doménu 2 (HD2) zodpovědnou za vazbu k membráně. Dosazením peptidu LAH4, FSW, nebo polyargininu namísto sekvence HD2 nicméně nevedlo ke zvýšení účinnosti transdukce. Naopak došlo ke snížení účinnosti transdukce. S tímto výsledkem koreluje i studie od Huérfano *et al.* (2017), kde ztráta funkce HD2 vedla ke ztrátě infekčnosti částic. Tyto poznatky tak podporují tvrzení od Huerfano *et al.* (2010), že přítomnost HD2 spolu s HD3 v sekvenci proteinu VP2/VP3 jsou potřebné k zachování vlastnosti chovat se jako předpokládaný viroporín. Navržené modifikace VP3 pomocí CPP tuto vlastnost bohužel nenahradily ani neposílily, ačkoliv interakce CPP s membránami byly dostatečně dokumentovány v literatuře (Herce *et al.*, 2009; Islami *et al.*, 2014; Maier *et al.*, 2010).

Přestože se očekávalo, že přítomnost VP2 výrazně zvýší transdukční potenciál modifikovaných pseudovirionů, porovnáním dat získaných z luciferázového testu mezi variantou modifikovaných pseudovirionů s VP2 a variantou pseudovirionů bez VP2 nebyl zaznamenán významný posun ( $p > 0,05$ ) v účinnosti transdukce. VP2 má na rozdíl od VP3 dodatečnou hydrofobní doménu 1 a myristilovou skupinu na N-konci (Huérfano *et al.*, 2017; Streuli a Griffin, 1987). Oba tyto rysy VP2 se zdají být významné pro infekčnost částic (Huerfano *et al.*, 2010; Huérfano *et al.*, 2017; Rainey-Barger *et al.*, 2007). Vyšší účinnosti transdukce současně nasvědčovalo i množství enkapsidovaného plazmidu u varianty pseudovirionů s VP2. Je pravděpodobné, že nízké množství VP2 nebylo dostatečné pro zlepšení úniku pseudovirionů z ER. Na druhou stranu mohlo být množství VP2 dostatečné k ovlivnění množství enkapsidovaného plazmidu (viz kapitola 5.2.4.1) a dokonce k přispění enkapsidaci RNA (viz kapitola 5.2.4.2).

Výsledky tak nasvědčují tomu, že vybrané modifikace pseudovirionů získané a analyzované v této diplomové práci nejsou vhodné pro zvýšení účinnosti transdukce. Každopádně se zdá, že nejefektivnější zaznamenanou formou modifikace bylo dosažení u pseudovirionů, u kterých došlo k zabudování CPP na C-konec nezkráceného VP3. Za zajímavé zjištění se dá považovat i efekt DNázy I na nemodifikované pseudoviriony PsV\_VP123, u kterých došlo ke zvýšení transdukčního potenciálu právě v přítomnosti DNázy I. Dalším poněkud zajímavým zjištěním je schopnost částic enkapsidovat RNA v přítomnosti VP2. Současně je pozoruhodné i zjištění, že v přítomnosti VP2 docházelo k enkapsidaci vyššího množství plazmidu. Nejvýraznější vliv byl pozorován u vzorku PsV\_VP1/2+R8-tVP3, kdy bylo enkapsidováno 7x více plazmidu než u nemodifikovaných částic PsV\_VP123 a enkapsidováno 27x více plazmidu než u varianty částic bez VP2 (PsV\_VP1+R8-tVP3).

Ačkoliv tato práce nepřinesla povzbudivé výsledky ve snaze nabídnout nový způsob, jak zlepšit pomocí genetické modifikace vnášející CPP potenciální transdukční systém založený na přípravě modifikovaných částic odvozených od MPyV, přinesla mnoho pozoruhodných dat a zjištění, které svou podstatou přispívají k lepšímu pochopení dopravních systémů založených na MPyV. Současně tyto poznatky mohou také přispět při návrhu budoucích modifikací za účelem zvýšení účinnosti transdukce u částic odvozených od MPyV.

## 7. Souhrn

Tato práce si kladla za cíl zjistit, zda je možné pomocí přímé (genetické) modifikace minoritního strukturního proteinu VP3 vybranými CPP posílit předpokládanou viroporínovou funkci minoritních strukturních proteinů a zvýšit tak účinnost transdukce polyomavirových částic do lidských buněk.

Modifikované i kontrolní nemodifikované PsV se podařilo úspěšně vyprodukovat, izolovat a ověřit jejich přítomnost ve všech izolátech přímou detekcí pomocí TEM. Velikost částic byla naměřena ze snímků TEM pomocí softwaru ImageJ. Statistickou analýzou velikostí modifikovaných a nemodifikovaných částic byly nalezeny statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) u většiny modifikovaných PsV. Statisticky významné rozdíly nebyly detekovány pouze u vzorků PsV\_VP1/2+VP3-R8 a PsV\_VP1/2+VP3-LAH4 ( $p < 0,05$ ).

Přítomnost virových proteinů ve vzorcích byla ověřena metodou SDS-PAGE společně s následným přenášením na nitrocelulózovou membránu a vizualizací proteinů pomocí komerčního činidla a značené protilátky. Úspěšně se podařilo ověřit přítomnost majoritního strukturního proteinu VP1 u všech charakterizovaných vzorků. Přítomnost minoritních strukturních proteinů se podařilo ověřit u téměř všech vzorků s výjimkou: PsV\_VP1/2+VP3-R8 (nepodařilo se ověřit VP2); PsV\_VP1/2+R8-tVP3 (nepodařilo se ověřit VP2 a tVP3); PsV\_VP1/2+VP3-LAH4 (nepodařilo se ověřit VP3). Dodatečně nebyla ověřována přítomnost strukturních proteinů u vzorku PsV\_VP1+FSW-tVP3. (viz tabulka 11)

Hmotnostní spektrometrií byl analyzován jediný vzorek (PsV\_VP1+VP3-LAH4) za účelem, zda je možné touto metodou ověřit přítomnost příslušné modifikace na VP3/tVP3 u vysoce purifikovaných PsV. Přítomnost modifikace se touto metodou nepodařilo ověřit.

Přítomnost enkapsidované pDNA byla úspěšně ověřena metodou qPCR pro všechny vzorky. Pomocí qPCR byla současně provedena absolutní kvantifikace enkapsidované pDNA. Statistickou analýzou množství enkapsidované pDNA mezi modifikovanými PsV a kontrolními nemodifikovanými PsV nebyly detekovány statisticky významné rozdíly ( $p > 0,05$ ). Avšak porovnáním varianty PsV s VP2 a varianty PsV bez VP2 obsahující stejnou modifikaci byly ve všech případech zjištěny statisticky signifikantní rozdíly ( $p < 0,05$ ).

Metodou luciferázového testu byla změřena účinnost transdukce modifikovaných a nemodifikovaných částic. Výsledky ukazují, že modifikované PsV měly velmi nízkou transdukční schopnost oproti nemodifikovaným PsV. Navrhnuté modifikace proto nejsou vhodné pro zvýšení účinnosti transdukce genů zájmu do lidských buněk 293TT.

Vzorek	Přítomnost tubulárních struktur (TEM)	Průměrná velikost částic (nm)	Variabilita velikosti částic (nm)	Detekce VP1	Detekce VP2	Detekce VP3/tVP3	N-, nebo C-koncová modifikace	VP3, nebo tVP3	Přítomnost enkapsidované pDNA	Účinnost transdukcce (bez DNázy I)
PsV_VP123	Ne	48,7	26 až 64	38	Ano	Ano	---	VP3	Ano	1,00x
PsV_VP1	Ano	38,9	11 až 94	83	---	---	---	---	Ano	0,28x
PsV_VP1+VP3-R8	Ano	40,8	13 až 66	53	---	Ano	C	VP3	Ano	0,33x
PsV_VP1+R8-tVP3	Ne	45,2	12 až 67	55	---	Ano	N	tVP3	Ano	0,26x
PsV_VP1+VP3-LAH4	Ne	54,8	16 až 75	59	---	Ano	C	VP3	Ano	0,85x
PsV_VP1/2+VP3-R8	Ne	48,4	26 až 75	49	Ne	Ano	C	VP3	Ano	0,89x
PsV_VP1/2+R8-tVP3	Ne	45,6	26 až 66	30	Ne	Ne	N	tVP3	Ano	7,11x
PsV_VP1/2+VP3-LAH4	Ano	47,8	16 až 73	57	Ano*	Ne	C	VP3	Ano	1,98x
PsV_VP1+tVP3-LAH4R	Ano	39,6	11 až 67	56	---	Ano	C	tVP3	Ano	4,26x
PsV_VP1+LAH4-tVP3	Ne	46,8	15 až 68	53	---	Ne	N	tVP3	Ano	4,12x
PsV_VP1+FSW-tVP3	Ano	44,7	14 až 77	63	n/a	n/a	N	tVP3	Ano	4,33x

**Tabulka 11: Souhrnná tabulka získaných dat všech používaných vzorků** – Přítomnost tubulárních struktur na snímcích z TEM u vzorků frakční skupiny A (viz obrázek 14); Průměrná velikost částic (viz kapitola 5.2.1); Variabilita velikosti částic ukazuje v levém sloupci minimum a maximum, zatímco v pravém sloupci je vypočten rozdíl naměřené maximální a minimální velikosti částic (viz kapitola 5.2.1); Sloupce „Detekce“ vyjadřují, zda se podařilo ověřit přítomnost strukturních proteinů metodou barvení komerčním činidlem a značenou profilátkou („Ano“ vyjadřuje, že daný protein byl detekován pouze jednou metodou) (viz kapitola 5.2.3). Informace o přítomnosti enkapsidované pDNA je rozdělena do dvou sloupců: sloupec vlevo vyjadřuje, zda byla enkapsidovaná pDNA přítomna a sloupec vpravo vyjadřuje násobek množství enkapsidované pDNA kontrolního vzorku PsV\_VP123 (viz kapitola 5.2.4.1); Poslední sloupec tabulky vyjadřuje účinnost transdukcce vypočtené z dat získaných z luciferázového testu bez DNázy I (viz kapitola 5.3.2). Procentuální účinnost transdukcce všech vzorků je vztažena ke kontrolnímu vzorku PsV\_VP123, jehož účinnost transdukcce je považována za 100%.



## 8. Seznam použité literatury

- Abbing, A., Blaschke, U.K., Grein, S., Kretschmar, M., Stark, C.M.B., Thies, M.J.W., Walter, J., Weigand, M., Woith, D.C., Hess, J., *et al.* (2004). Efficient intracellular delivery of a protein and a low molecular weight substance via recombinant polyomavirus-like particles. *J. Biol. Chem.* 279, 27410–27421.
- Baker, T.S., Caspar, D.L.D., Murakami, W.T. (1983). Polyoma virus ‘hexamer’ tubes consist of paired pentamers. *Nature* 303, 446–448.
- Barouch, D.H., Harrison, S.C. (1994). Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J. Virol.* 68, 3982–3989.
- Bauer, P.H., Cui, C., Stehle, T., Harrison, S.C., DeCaprio, J.A., Benjamin, T.L. (1999). Discrimination between Sialic Acid-Containing Receptors and Pseudoreceptors Regulates Polyomavirus Spread in the Mouse. *J. Virol.* 73, 5826–5832.
- Bechinger, B., Vidovic, V., Bertani, P., Kichler, A. (2011). A new family of peptide-nucleic acid nanostructures with potent transfection activities. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* 17, 88–93.
- Borrelli, A., Tornesello, A.L., Tornesello, M.L., Buonaguro, F.M. (2018). Cell Penetrating Peptides as Molecular Carriers for Anti-Cancer Agents. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* 23.
- Brady, J.N., Winston, V.D., Consigli, R.A. (1977). Dissociation of polyoma virus by the chelation of calcium ions found associated with purified virions. *J. Virol.* 23, 717–724.
- Buch, M.H.C., Liaci, A.M., O’Hara, S.D., Garcea, R.L., Neu, U., Stehle, T. (2015). Structural and Functional Analysis of Murine Polyomavirus Capsid Proteins Establish the Determinants of Ligand Recognition and Pathogenicity. *PLoS Pathog.* 11.
- Buck, C.B., Pastrana, D.V., Lowy, D.R., Schiller, J.T. (2004). Efficient Intracellular Assembly of Papillomaviral Vectors. *J. Virol.* 78, 751–757.
- Calvignac-Spencer, S., Feltkamp, M.C.W., Daugherty, M.D., Moens, U., Ramqvist, T., Johne, R., Ehlers, B. (2016). A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Arch. Virol.* 161, 1739–1750.
- Carbone, M., Ascione, G., Chichiarelli, S., Garcia, M.-I., Eufemi, M., Amati, P. (2004). Chromosome-Protein Interactions in Polyomavirus Virions. *J. Virol.* 78, 513–519.
- Caruso, M., Belloni, L., Sthandier, O., Amati, P., Garcia, M.-I. (2003).  $\alpha 4\beta 1$  Integrin Acts as a Cell Receptor for Murine Polyomavirus at the Postattachment Level. *J. Virol.* 77, 3913–3921.
- Crémisi, C., Pignatti, P.F., Yaniv, M. (1976). Random location and absence of movement of the nucleosomes on SV 40 nucleoprotein complex isolated from infected cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73, 548–554.
- Dalba, C., Bellier, B., Kasahara, N., Klatzmann, D. (2007). Replication-competent Vectors and Empty Virus-like Particles: New Retroviral Vector Designs for Cancer Gene Therapy or Vaccines. *Mol. Ther.* 15, 457–466.
- Delos, S.E., Cripe, T.P., Leavitt, A.D., Greisman, H., Garcea, R.L. (1995). Expression of the polyomavirus minor capsid proteins VP2 and VP3 in *Escherichia coli*: in vitro interactions with recombinant VP1 capsomeres. *J. Virol.* 69, 7734–7742.
- Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G., Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 10444–10450.
- Duchardt, F., Fotin-Mleczek, M., Schwarz, H., Fischer, R., Brock, R. (2007). A Comprehensive Model for the Cellular Uptake of Cationic Cell-penetrating Peptides. *Traffic* 8, 848–866.

- Eguchi, A., Akuta, T., Okuyama, H., Senda, T., Yokoi, H., Inokuchi, H., Fujita, S., Hayakawa, T., Takeda, K., Hasegawa, M., *et al.* (2001). Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 276, 26204–26210.
- Elmqvist, A., Hansen, M., Langel, Ü. (2006). Structure–activity relationship study of the cell-penetrating peptide pVEC. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1758, 721–729.
- El-Sayed, A., Khalil, I.A., Kogure, K., Futaki, S., Harashima, H. (2008). Octaarginine- and Octalysine-modified Nanoparticles Have Different Modes of Endosomal Escape. *J. Biol. Chem.* 283, 23450–23461.
- Endoh, T., Ohtsuki, T. (2009). Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptides modified for endosomal escape. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 704–709.
- Erickson, K.D., Bouchet-Marquis, C., Heiser, K., Szomolanyi-Tsuda, E., Mishra, R., Lamothe, B., Hoenger, A., Garcea, R.L. (2012). Virion Assembly Factories in the Nucleus of Polyomavirus-Infected Cells. *PLoS Pathog.* 8.
- Eto, Y., Yoshioka, Y., Asavatanabodee, R., Kida, S., Maeda, M., Mukai, Y., Mizuguchi, H., Kawasaki, K., Okada, N., Nakagawa, S. (2009). Transduction of adenovirus vectors modified with cell-penetrating peptides. *Peptides* 30, 1548–1552.
- Ewers, H., Helenius, A. (2011). Lipid-Mediated Endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.
- Fluck, M.M., Schaffhausen, B.S. (2009). Lessons in Signaling and Tumorigenesis from Polyomavirus Middle T Antigen. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 73, 542–563.
- Forstová, J., Krauzewicz, N., Wallace, S., Street, A.J., Dilworth, S.M., Beard, S., Griffin, B.E. (1993). Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *J. Virol.* 67, 1405–1413.
- Forstová, J., Krauzewicz, N., Sandig, V., Elliott, J., Palková, Z., Strauss, M., Griffin, B.E. (1995). Polyoma Virus Pseudocapsids as Efficient Carriers of Heterologous DNA into Mammalian Cells. *Hum. Gene Ther.* 6, 297–306.
- Frankel, A.D., Pabo, C.O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55, 1189–1193.
- Fried, H., Cahan, L.D., Paulson, J.C. (1981). Polyoma virus recognizes specific sialyligosaccharide receptors on host cells. *Virology* 109, 188–192.
- Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., Sugiura, Y. (2001). Arginine-rich Peptides AN ABUNDANT SOURCE OF MEMBRANE-PERMEABLE PEPTIDES HAVING POTENTIAL AS CARRIERS FOR INTRACELLULAR PROTEIN DELIVERY. *J. Biol. Chem.* 276, 5836–5840.
- Futaki, S., Nakase, I., Tadokoro, A., Takeuchi, T., Jones, A.T. (2007). Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 784–787.
- Garcea, R.L., Salunke, D.M., Caspar, D.L.D. (1987). Site-directed mutation affecting polyomavirus capsid self-assembly in vitro. *Nature* 329, 86–87.
- Gilbert, J., Benjamin, T. (2004). Uptake Pathway of Polyomavirus via Ganglioside GD1a. *J. Virol.* 78, 12259–12267.
- Gilbert, J.M., Benjamin, T.L. (2000). Early Steps of Polyomavirus Entry into Cells. *J. Virol.* 74, 8582–8588.
- Gilbert, J., Dahl, J., Riney, C., You, J., Cui, C., Holmes, R., Lencer, W., Benjamin, T. (2005). Ganglioside GD1a Restores Infectibility to Mouse Cells Lacking Functional Receptors for Polyomavirus. *J. Virol.* 79, 615–618.
- Gilbert, J.M., Goldberg, I.G., Benjamin, T.L. (2003). Cell Penetration and Trafficking of Polyomavirus. *J. Virol.* 77, 2615–2622.

- Gillock, E.T., Rottinghaus, S., Chang, D., Cai, X., Smiley, S.A., An, K., Consigli, R.A. (1997). Polyomavirus major capsid protein VP1 is capable of packaging cellular DNA when expressed in the baculovirus system. *J. Virol.* 71, 2857–2865.
- Gonzalez, M.E., Carrasco, L. (2003). Viroporins. *FEBS Lett.* 552, 28–34.
- Guidotti, G., Brambilla, L., Rossi, D. (2017). Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 406–424.
- Han, T., Tang, Y., Ugai, H., Perry, L.E., Siegal, G.P., Contreras, J.L., Wu, H. (2007). Genetic incorporation of the protein transduction domain of Tat into Ad5 fiber enhances gene transfer efficacy. *Virol. J.* 4, 103.
- Herce, H.D., Garcia, A.E. (2007). Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 20805–20810.
- Herce, H.D., Garcia, A.E., Litt, J., Kane, R.S., Martin, P., Enrique, N., Rebolledo, A., Milesi, V. (2009). Arginine-Rich Peptides Destabilize the Plasma Membrane, Consistent with a Pore Formation Translocation Mechanism of Cell-Penetrating Peptides. *Biophys. J.* 97, 1917–1925.
- Herce, H.D., Garcia, A.E., Cardoso, M.C. (2014). Fundamental Molecular Mechanism for the Cellular Uptake of Guanidinium-Rich Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 17459–17467.
- Hitchcock, S.E. (1980). Actin deoxyribonuclease I interaction. Depolymerization and nucleotide exchange. *J. Biol. Chem.* 255, 5668–5673.
- Hitz, T., Iten, R., Gardiner, J., Namoto, K., Walde, P., Seebach, D. (2006). Interaction of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Oligoarginine-Acids and Amides with Anionic Lipid Vesicles: A Mechanistic and Thermodynamic Study. *Biochemistry* 45, 5817–5829.
- Horníková, L., Žíla, V., Španielová, H., Forstová, J. (2015). Mouse Polyomavirus: Propagation, Purification, Quantification, and Storage. *Curr. Protoc. Microbiol.* 38, 14F.1.1-26.
- Horníková, L., Fraiberk, M., Man, P., Janovec, V., Forstová, J. (2017). VP1, the major capsid protein of the mouse polyomavirus, binds microtubules, promotes their acetylation and blocks the host cell cycle. *FEBS J.* 284, 301–323.
- Huerfano, S., Zíla, V., Boura, E., Španielová, H., Stokrová, J., Forstová, J. (2010). Minor capsid proteins of mouse polyomavirus are inducers of apoptosis when produced individually but are only moderate contributors to cell death during the late phase of viral infection. *FEBS J.* 277, 1270–1283.
- Huérano, S., Ryabchenko, B., Španielová, H., Forstová, J. (2017). Hydrophobic domains of mouse polyomavirus minor capsid proteins promote membrane association and virus exit from the ER. *FEBS J.* 284, 883–902.
- Chang, D., Haynes, J.I., Brady, J.N., Consigli, R.A. (1992). Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. *Virology* 191, 978–983.
- Chang, D., Cai, X., Consigli, R.A. (1993a). Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid protein. *J. Virol.* 67, 6327–6331.
- Chang, D., Haynes, J.I., Brady, J.N., Consigli, R.A. (1993b). Identification of amino acid sequences in the polyomavirus capsid proteins that serve as nuclear localization signals. *Trans. Kans. Acad. Sci. Kans. Acad. Sci.* 96, 35–39.
- Chen, H.-Z., Wu, C.P., Chao, Y.-C., Liu, C.Y.-Y. (2011). Membrane penetrating peptides greatly enhance baculovirus transduction efficiency into mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405, 297–302.

- Chen, X.S., Stehle, T., Harrison, S.C. (1998). Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J.* 17, 3233–3240.
- Chromy, L.R., Oltman, A., Estes, P.A., Garcea, R.L. (2006). Chaperone-Mediated In Vitro Disassembly of Polyoma- and Papillomaviruses. *J. Virol.* 80, 5086–5091.
- Ishizu, K.-I., Watanabe, H., Han, S.-I., Kanesashi, S.-N., Hoque, M., Yajima, H., Kataoka, K., Handa, H. (2001). Roles of Disulfide Linkage and Calcium Ion-Mediated Interactions in Assembly and Disassembly of Virus-Like Particles Composed of Simian Virus 40 VP1 Capsid Protein. *J. Virol.* 75, 61–72.
- Islami, M., Mehrnejad, F., Doustdar, F., Alimohammadi, M., Khadem-Maaref, M., Mir-Derikvand, M., Taghdir, M. (2014). Study of Orientation and Penetration of LAH4 into Lipid Bilayer Membranes: pH and Composition Dependence. *Chem. Biol. Drug Des.* 84, 242–252.
- Jariyapong, P., Chotwiwatthanakun, C., Somrit, M., Jitrapakdee, S., Xing, L., Cheng, H.R., Weerachatanukul, W. (2014). Encapsulation and delivery of plasmid DNA by virus-like nanoparticles engineered from *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus. *Virus Res.* 179, 140–146.
- Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., Prochiantz, A. (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 1864–1868.
- Karro, K., Männik, T., Männik, A., Ustav, M. (2015). DNA Transfer into Animal Cells Using Stearylated CPP Based Transfection Reagent. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1324, 435–445.
- Kawamoto, S., Takasu, M., Miyakawa, T., Morikawa, R., Oda, T., Futaki, S., Nagao, H. (2011). Inverted micelle formation of cell-penetrating peptide studied by coarse-grained simulation: Importance of attractive force between cell-penetrating peptides and lipid head group. *J. Chem. Phys.* 134, 095103.
- Kawano, M., Matsui, M., Handa, H. (2018). Chapter 15 - Technologies that generate and modify virus-like particles for medical diagnostic and therapy purposes. In *Design and Development of New Nanocarriers*, A.M. Grumezescu, ed. (William Andrew Publishing), pp. 555–594.
- Kichler, A., Leborgne, C., März, J., Danos, O., Bechinger, B. (2003). Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1564–1568.
- Kichler, A., Mason, A.J., Bechinger, B. (2006). Cationic amphipathic histidine-rich peptides for gene delivery. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 301–307.
- Koren, E., Torchilin, V.P. (2012). Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. *Trends Mol. Med.* 18, 385–393.
- Krauzewicz, N., Streuli, C.H., Stuart-Smith, N., Jones, M.D., Wallace, S., Griffin, B.E. (1990). Myristylated polyomavirus VP2: role in the life cycle of the virus. *J. Virol.* 64, 4414–4420.
- Krauzewicz, N., Cox, C., Soeda, E., Clark, B., Rayner, S., Griffin, B.E. (2000). Sustained ex vivo and in vivo transfer of a reporter gene using polyoma virus pseudocapsids. *Gene Ther.* 7, 1094–1102.
- Kuksin, D., Norkin, L.C. (2012). Disassociation of the SV40 Genome from Capsid Proteins Prior to Nuclear Entry. *Virol. J.* 9, 158.
- Lagatie, O., Tritsmans, L., Stuyver, L.J. (2013). The miRNA world of polyomaviruses. *Virol. J.* 10, 268.
- Langlet-Bertin, B., Leborgne, C., Scherman, D., Bechinger, B., Mason, A.J., Kichler, A. (2010). Design and evaluation of histidine-rich amphipathic peptides for siRNA delivery. *Pharm. Res.* 27, 1426–1436.

- Liddington, R.C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T.L., Harrison, S.C. (1991). Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* 354, 278–284.
- Liebl, D., Difato, F., Horníková, L., Mannová, P., Štokrová, J., Forstová, J. (2006). Mouse Polyomavirus Enters Early Endosomes, Requires Their Acidic pH for Productive Infection, and Meets Transferrin Cargo in Rab11-Positive Endosomes. *J. Virol.* 80, 4610–4622.
- Lilley, B.N., Gilbert, J.M., Ploegh, H.L., Benjamin, T.L. (2006). Murine Polyomavirus Requires the Endoplasmic Reticulum Protein Derlin-2 To Initiate Infection. *J. Virol.* 80, 8739–8744.
- Liu, S., Mao, Q., Zhang, W., Zheng, X., Bian, Y., Wang, D., Li, H., Chai, L., Zhao, J., Xia, H. (2009). Genetically modified adenoviral vector with the protein transduction domain of Tat improves gene transfer to CAR-deficient cells. *Biosci. Rep.* 29, 103–109.
- Liu, Y., Kim, Y.J., Ji, M., Fang, J., Siriwon, N., Zhang, L.I., Wang, P. (2014). Enhancing gene delivery of adeno-associated viruses by cell-permeable peptides. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 1, 12.
- Luo, Y., Han, Y., Hu, X., Yin, M., Wu, C., Li, Q., Chen, N., Zhao, Y. (2019). Live-cell imaging of octaarginine-modified polymer dots via single particle tracking. *Cell Prolif.*
- Magnuson, B., Rainey, E.K., Benjamin, T., Baryshev, M., Mkrtchian, S., Tsai, B. (2005). ERp29 Triggers a Conformational Change in Polyomavirus to Stimulate Membrane Binding. *Mol. Cell* 20, 289–300.
- Maier, O., Galan, D.L., Wodrich, H., Wiethoff, C.M. (2010). An N-terminal Domain of Adenovirus Protein VI Fragments Membranes By Inducing Positive Membrane Curvature. *Virology* 402, 11–19.
- Maiolo, J.R., Ferrer, M., Ottinger, E.A. (2005). Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1712, 161–172.
- Majdoul, S., Seye, A.K., Kichler, A., Holic, N., Galy, A., Bechinger, B., Fenard, D. (2016). Molecular Determinants of Vectofusin-1 and Its Derivatives for the Enhancement of Lentivirally Mediated Gene Transfer into Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *J. Biol. Chem.* 291, 2161–2169.
- Malboeuf, C.M., Simon, D.A.L., Lee, Y.-E.E., Lankes, H.A., Dewhurst, S., Frelinger, J.G., Rose, R.C. (2007). Human papillomavirus-like particles mediate functional delivery of plasmid DNA to antigen presenting cells in vivo. *Vaccine* 25, 3270–3276.
- Mannová, P., Liebl, D., Krauzewicz, N., Fejtová, A., Štokrová, J., Palková, Z., Griffin, B.E., Forstová, J. (2002). Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *J. Gen. Virol.* 83, 2309–2319.
- Mattern, C.F.T., Takemoto, K.K., DeLeva, A.M. (1967). Electron microscopic observations on multiple polyoma virus-related particles. *Virology* 32, 378–392.
- Midoux, P., Pichon, C., Yaouanc, J.-J., Jaffrès, P.-A. (2009). Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *Br. J. Pharmacol.* 157, 166–178.
- Moreland, R.B., Garcea, R.L. (1991). Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1. *Virology* 185, 513–518.
- Moreland, R.B., Montross, L., Garcea, R.L. (1991). Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1. *J. Virol.* 65, 1168–1176.
- Morris, M.C., Deshayes, S., Heitz, F., Divita, G. (2008). Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biol. Cell* 100, 201–217.
- Moulay, G., Leborgne, C., Mason, A.J., Aisenbrey, C., Kichler, A., Bechinger, B. (2017). Histidine-rich designer peptides of the LAH4 family promote cell delivery of a multitude of cargo. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* 23, 320–328.

- Moyer, C.L., Nemerow, G.R. (2012). Disulfide-Bond Formation by a Single Cysteine Mutation in Adenovirus Protein VI Impairs Capsid Release and Membrane Lysis. *Virology* 428, 41–47.
- Moyer, C.L., Wiethoff, C.M., Maier, O., Smith, J.G., Nemerow, G.R. (2011). Functional Genetic and Biophysical Analyses of Membrane Disruption by Human Adenovirus. *J. Virol.* 85, 2631–2641.
- Murayama, T., Pujals, S., Hirose, H., Nakase, I., Futaki, S. (2016). Effect of amino acid substitution in the hydrophobic face of amphiphilic peptides on membrane curvature and perturbation: N-terminal helix derived from adenovirus internal protein VI as a model. *Biopolymers* 106, 430–439.
- Nakase, I., Tadokoro, A., Kawabata, N., Takeuchi, T., Katoh, H., Hiramoto, K., Negishi, M., Nomizu, M., Sugiura, Y., Futaki, S. (2007). Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. *Biochemistry* 46, 492–501.
- Nakase, I., Konishi, Y., Ueda, M., Saji, H., Futaki, S. (2012). Accumulation of arginine-rich cell-penetrating peptides in tumors and the potential for anticancer drug delivery in vivo. *J. Controlled Release* 159, 181–188.
- Neu, U., Stehle, T., Atwood, W.J. (2009). The Polyomaviridae: Contributions of virus structure to our understanding of virus receptors and infectious entry. *Virology* 384, 389–399.
- Nigatu, A.S., Vupputuri, S., Flynn, N., Ramsey, J.D. (2015). Effects of cell-penetrating peptides on transduction efficiency of PEGylated adenovirus. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 71, 153–160.
- Oehlke, J., Scheller, A., Wiesner, B., Krause, E., Beyermann, M., Klauschenz, E., Melzig, M., Bienert, M. (1998). Cellular uptake of an  $\alpha$ -helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1414, 127–139.
- Osterman, J.V., Waddell, A., Aposhian, H.V. (1970). DNA and Gene Therapy: Uncoating of Polyoma Pseudovirus in Mouse Embryo Cells\*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 67, 37–40.
- Palková, Z., Adamec, T., Liebl, D., Štokrová, J., Forstová, J. (2000). Production of polyomavirus structural protein VP1 in yeast cells and its interaction with cell structures. *FEBS Lett.* 478, 281–289.
- Park, J., Ryu, J., Kim, K.-A., Lee, H.J., Bahn, J.H., Han, K., Choi, E.Y., Lee, K.S., Kwon, H.Y., Choi, S.Y. (2002). Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells. *J. Gen. Virol.* 83, 1173–1181.
- Park, S.-H., Doh, J., Park, S.I., Lim, J.Y., Kim, S.M., Youn, J.-I., Jin, H.-T., Seo, S.-H., Song, M.-Y., Sung, S.Y., *et al.* (2010). Branched oligomerization of cell-permeable peptides markedly enhances the transduction efficiency of adenovirus into mesenchymal stem cells. *Gene Ther.* 17, 1052–1061.
- Qian, M., Cai, D., Verhey, K.J., Tsai, B. (2009). A Lipid Receptor Sorts Polyomavirus from the Endolysosome to the Endoplasmic Reticulum to Cause Infection. *PLOS Pathog.* 5, e1000465.
- Rainey-Barger, E.K., Magnuson, B., Tsai, B. (2007). A Chaperone-Activated Nonenveloped Virus Perforates the Physiologically Relevant Endoplasmic Reticulum Membrane. *J. Virol.* 81, 12996.
- Ramakrishna, S., Kwaku Dad, A.-B., Beloor, J., Gopalappa, R., Lee, S.-K., Kim, H. (2014). Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res.* 24, 1020–1027.

- Ramsey, J.D., Flynn, N.H. (2015). Cell-penetrating peptides transport therapeutics into cells. *Pharmacol. Ther.* 154, 78–86.
- Raucher, D., Ryu, J.S. (2015). Cell-penetrating peptides: strategies for anticancer treatment. *Trends Mol. Med.* 21, 560–570.
- Rayment, I., Baker, T.S., Caspar, D.L.D., Murakami, W.T. (1982). Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature* 295, 110–115.
- Rhee, M., Davis, P. (2006). Mechanism of uptake of C105Y, a novel cell-penetrating peptide. *J. Biol. Chem.* 281, 1233–1240.
- Richard, J.P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M.J., Chernomordik, L.V., Lebleu, B. (2003). Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.* 278, 585–590.
- Richterová, Z., Liebl, D., Horák, M., Palková, Z., Štokrová, J., Hozák, P., Korb, J., Forstová, J. (2001). Caveolae Are Involved in the Trafficking of Mouse Polyomavirus Virions and Artificial VP1 Pseudocapsids toward Cell Nuclei. *J. Virol.* 75, 10880–10891.
- Ruan, G., Agrawal, A., Marcus, A.I., Nie, S. (2007). Imaging and tracking of tat peptide-conjugated quantum dots in living cells: new insights into nanoparticle uptake, intracellular transport, and vesicle shedding. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 14759–14766.
- Sahli, R., Freund, R., Dubensky, T., Garcea, R., Bronson, R., Benjamin, T. (1993). Defect in Entry and Altered Pathogenicity of a Polyoma Virus Mutant Blocked in VP2 Myristylation. *Virology* 192, 142–153.
- Salunke, D.M., Caspar, D.L.D., Garcea, R.L. (1986). Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* 46, 895–904.
- Salunke, D.M., Caspar, D.L., Garcea, R.L. (1989). Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophys. J.* 56, 887–900.
- Schmidt, U., Rudolph, R., Böhm, G. (2000). Mechanism of Assembly of Recombinant Murine Polyomavirus-Like Particles. *J. Virol.* 74, 1658–1662.
- Shai, Y. (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 66, 236–248.
- Slilaty, S.N., Berns, K.I., Aposhian, H.V. (1982). Polyoma-like particle: characterization of the DNA encapsidated in vitro by polyoma empty capsids. *J. Biol. Chem.* 257, 6571–6575.
- Soldatova, I., Prilepskaja, T., Abrahamyan, L., Forstová, J., Huérfano, S. (2018). Interaction of the Mouse Polyomavirus Capsid Proteins with Importins Is Required for Efficient Import of Viral DNA into the Cell Nucleus. *Viruses* 10.
- Spanielová, H., Fraiberk, M., Suchanová, J., Soukup, J., Forstová, J. (2014). The encapsidation of polyomavirus is not defined by a sequence-specific encapsidation signal. *Virology* 450–451, 122–131.
- Štach, M. (2016). Studium pohybu polyomavirů z pozdního endozomu směrem k buněčnému jádru. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- Stamatos, N.M., Chakrabarti, S., Moss, B., Hare, J.D. (1987). Expression of polyomavirus virion proteins by a vaccinia virus vector: association of VP1 and VP2 with the nuclear framework. *J. Virol.* 61, 516–525.
- Stehle, T., Harrison, S.C. (1996). Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure* 4, 183–194.
- Stehle, T., Harrison, S.C. (1997). High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *EMBO J.* 16, 5139–5148.
- Stehle, T., Gamblin, S.J., Yan, Y., Harrison, S.C. (1996). The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure* 4, 165–182.

- Streuli, C.H., Griffin, B.E. (1987). Myristic acid is coupled to a structural protein of polyoma virus and SV40. *Nature* 326, 619–622.
- Suchanová, J., Španielová, H., Forstová, J. (2015). Applications of Viral Nanoparticles Based on Polyomavirus and Papillomavirus Structures. *In*: Khudyakov, Y., Pumpens, P. (eds.): *Viral Nanotechnology*, (Boca Raton: CRC Press), 303–344.
- Sunavala-Dossabhoy, G. (2020). Smart cell-specific protein therapeutics for head and neck cancer. *Oral Dis.* 26, 3–5.
- Suwalsky, M., Traub, W. (1972). A comparative X-ray study of a nucleoprotamine and DNA complexes with polylysine and polyarginine. *Biopolymers* 11, 2223–2231.
- Suzuki, T., Futaki, S., Niwa, M., Tanaka, S., Ueda, K., Sugiura, Y. (2002). Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides. *J. Biol. Chem.* 277, 2437–2443.
- Tolstov, Y.L., Pastrana, D.V., Feng, H., Becker, J.C., Jenkins, F.J., Moschos, S., Chang, Y., Buck, C.B., Moore, P.S. (2009). Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. *Int. J. Cancer* 125, 1250–1256.
- Tsai, B., Gilbert, J.M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T.L., Rapoport, T.A. (2003). Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J.* 22, 4346–4355.
- Tünnemann, G., Ter-Avetisyan, G., Martin, R.M., Stöckl, M., Herrmann, A., Cardoso, M.C. (2008). Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* 14, 469–476.
- Váňová, J., Hejtmánková, A., Kalbáčová, M.H., Španielová, H. (2019). The Utilization of Cell-Penetrating Peptides in the Intracellular Delivery of Viral Nanoparticles. *Materials* 12.
- Vivès, E., Brodin, P., Lebleu, B. (1997). A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus. *J. Biol. Chem.* 272, 16010–16017.
- Wang, G., Jia, T., Xu, X., Chang, L., Zhang, R., Fu, Y., Li, Y., Yang, X., Zhang, K., Lin, G., *et al.* (2016). Novel miR-122 delivery system based on MS2 virus like particle surface displaying cell-penetrating peptide TAT for hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 7, 59402–59416.
- Wiethoff, C.M., Wodrich, H., Gerace, L., Nemerow, G.R. (2005). Adenovirus Protein VI Mediates Membrane Disruption following Capsid Disassembly. *J. Virol.* 79, 1992–2000.
- Winston, V.D., Bolen, J.B., Consigli, R.A. (1980). Isolation and characterization of polyoma uncoating intermediates from the nuclei of infected mouse cells. *J. Virol.* 33, 1173–1181.
- Youn, J.-I., Park, S.-H., Jin, H.-T., Lee, C.-G., Seo, S.-H., Song, M.-Y., Lee, C.-W., Sung, Y.-C. (2008). Enhanced delivery efficiency of recombinant adenovirus into tumor and mesenchymal stem cells by a novel PTD. *Cancer Gene Ther.* 15, 703–712.
- Yu, D., Jin, C., Leja, J., Majdalani, N., Nilsson, B., Eriksson, F., Essand, M. (2011). Adenovirus with Hexon Tat-Protein Transduction Domain Modification Exhibits Increased Therapeutic Effect in Experimental Neuroblastoma and Neuroendocrine Tumors. *J. Virol.* 85, 13114–13123.
- Zhang, T.T., Kang, T.H., Ma, B., Xu, Y., Hung, C.-F., Wu, T.-C. (2012). LAH4 enhances CD8+ T cell immunity of protein/peptide-based vaccines. *Vaccine* 30, 784–793.
- Zila, V., Difato, F., Klimova, L., Huerfano, S., Forstova, J. (2014). Involvement of Microtubular Network and Its Motors in Productive Endocytic Trafficking of Mouse Polyomavirus. *PLOS ONE* 9, e96922.